

TESIS DE DOCTORADO



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

***ESTUDIO DE LAS TRANSFORMACIONES
FÍSICO – QUÍMICAS QUE SE PRODUCEN
DURANTE EL PROCESAMIENTO DE LAS
MASAS CONGELADAS***

Pablo Daniel Ribotta

*TESIS
Nº 972*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Departamento de Química
Departamento de Ciencias Biológicas

2002

IMPRESION...

Fecha 23-04-03
No. B. 57009



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
UNLP

TESIS
Nº 972

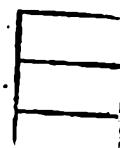
El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Bioquímicas fue realizado en el Laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, y en el Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba de la Agencia Córdoba Ciencia, bajo la dirección de la Dra. María Cristina Añón y la codirección del Dr. Alberto Edel León.

DEDICACION.....

A.....

Fecha 25-04-03

Inv. N°..... Inv. N° 57000



A mis Viejos

A Virginia y Julieta

Agradecimientos

A mi Directora Dra. María Cristina Añon por su inestimable apoyo, tiempo y esfuerzo.

Al Dr. Alberto León, no sólo en su función de director, sino por todos los buenos momentos compartidos, que fueron muchos.

A los integrantes de la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y en especial a Gabriela y Alicia, que me hicieron sentir parte del equipo de trabajo y por su constante apoyo.

A Martín por su predisposición y enseñanzas en la elaboración de los distintos productos.

A Isabel, Sara, Cecilia, Nora, Cachito, Adriana y demás integrantes del CIDCA, por su colaboración y apoyo, y principalmente porque me hicieron sentir parte de un equipo de trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca que me permitió llevar a cabo este estudio.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) de La Plata por haberme permitido desarrollar parte de mi trabajo en sus laboratorios.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba por haberme permitido realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones.

Al Centro de Excelencia en Procesos y Productos Córdoba (CEPROCOR), que facilitó sus instalaciones y los equipos para

realizar algunas de las determinaciones que formaron parte de este trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la Presidencia de la Nación por el financiamiento a través del Préstamo BID 1201-OC-AR N° PICT 09-07321.

Al Departamento de Química Analítica y Aplicada de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba por colaborar en mi formación.

Al Laboratorio de Caracterización Química y Morfología del CRIBABB-CONICET por la realización de las microfotografías.

Al Molino Carlos Boero Romano SAIC por la provisión de la harina de trigo utilizada en este estudio.

A la familia Bussi, Guillermo y Marcela por su hospitalidad en mis viajes a La Plata.

A mis viejos por el apoyo durante todos estos años.

A Virginia y Julieta.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
▪ Harina de trigo	4
▪ Proteínas	5
▪ Carbohidratos	10
▪ Componentes minoritarios	12
▪ Gluten	14
▪ Levaduras	20
▪ Gelatinización y retrogradación del almidón	26
▪ Envejecimiento de pan	30
▪ Congelación de la masa	32
▪ OBJETIVO GENERAL	35
▪ OBJETIVOS PARTICULARES	35
 MATERIALES Y MÉTODOS	 37
Elaboración del pan	38
▪ Harina	38
▪ Levadura	39
▪ Formulación de la masa	39
▪ Método de elaboración de pan	40
▪ Masas congeladas	40

▪ Pan precocido	41
Caracterización del pan	41
▪ Volumen y densidad de pan	41
▪ Estructura de la miga	42
▪ Textura de la miga	43
Caracterización estructural de la masa	44
▪ Viscoelasticidad de la masa	44
▪ Microscopía electrónica de barrido (SEM)	47
Caracterización de las proteínas	48
▪ Preparación de los extractos de proteínas	48
▪ Electroforesis	49
▪ Extracción de proteínas de los geles en “multistacking”	49
▪ Cuantificación de fracciones proteicas en los geles	50
▪ Cromatografía de exclusión molecular	50
Caracterización del almidón	51
▪ Calorimetría diferencial de barrido	51
▪ Gelatinización del almidón	52
▪ Retrogradación de la amilopectina	53
▪ Difracción de rayos-X	53
Análisis de levaduras	55
▪ Capacidad de producción de CO ₂	55
▪ Viabilidad de levaduras en masa	57
▪ Porcentaje de levaduras muertas	58
▪ Lixiviado de células	59
▪ Análisis de los lixiviados de células	59

Análisis estadístico	61
----------------------	----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
-------------------------------	-----------

PRIMERA SECCIÓN

CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA UTILIZADA PARA LA ELABORACIÓN DE MASA	63
--	----

▪ Análisis físico-químicos	64
▪ Difracción de rayos-X	65
▪ Proteínas de la harina de trigo	67

SEGUNDA SECCIÓN

EFFECTO DEL PROCESO DE CONGELACIÓN DE LA MASA SOBRE LOS PARÁMETROS TECNOLÓGICOS, REOLÓGICOS Y MICROESTRUCTURALES	71
--	----

▪ Efecto del tiempo de congelación de la masa sobre la calidad del pan	72
▪ Efecto del tiempo de congelación de la masa sobre la velocidad de endurecimiento de la miga de pan	76
▪ Efecto de la temperatura de congelación y descongelación de la masa	78
▪ Comportamiento viscoelástico de la masa	82
▪ Efecto del proceso de congelación de la masa sobre el comportamiento viscoelástico	84

▪ Efecto del proceso de congelación de la masa sobre la microestructura	89
▪ Correlación entre la calidad de pan y la viscoelásticidad de las masas	91

TERCERA SECCIÓN

EFFECTO DE LA CONGELACIÓN DE LA MASA SOBRE LAS TRANSFORMACIONES PRODUCIDAS EN LAS PROTEÍNAS, EL ALMIDÓN Y LAS LEVADURAS	93
Proteínas	94
▪ Efecto de la congelación de la masa sobre las proteínas de la harina	94
Almidón	106
▪ Efecto del cloruro de sodio y la levadura prensada sobre el proceso de gelatinización del almidón	106
▪ Efecto de la congelación de la masa sobre la gelatinización y la retrogradación del almidón	108
▪ Efecto del envejecimiento del pan sobre la cinética de retrogradación de amilopectina	112
▪ Efecto del envejecimiento de pan sobre la cinética de retrogradación del almidón medida por difracción de rayos-X	116
Levadura	123
▪ Efecto de la congelación de la masa y la levadura prensada sobre el proceso de elaboración de pan	123
▪ Efecto de la congelación de levadura sobre la capacidad de producción de gas y la viabilidad celular	126

- Influencia de los lixiviados de las células sobre las proteínas del gluten y la calidad del pan 129

CUARTA SECCIÓN

EFFECTO DE LOS ADITIVOS EN MASAS CONGELADAS	138
▪ Uso de aditivos en masas congeladas	139
▪ Efecto de la congelación de masas con aditivos sobre el endurecimiento del pan	147
▪ Efecto de la congelación sobre la gelatinización del almidón en masas con aditivos	150
▪ Efecto de la congelación de masas con aditivos sobre el comportamiento viscoelástico	152
▪ Efecto de la congelación de las masas con aditivos sobre las proteínas de la harina	158
▪ Efectos de la congelación sobre la microestructura de la masa con aditivos	160

QUINTA SECCIÓN

EFFECTO DEL PROCESO DE PRECOCCIÓN DE MASA SOBRE LA CALIDAD DEL PAN	165
▪ Efecto del tiempo de precocción y el almacenamiento de masa sobre la calidad del pan	167
▪ Efecto del tiempo de precocción sobre la evolución de la firmeza de los panes	170
▪ Efecto del tiempo de precocción sobre la levadura	171

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	173
---	------------

BIBLIOGRAFÍA	180
---------------------	------------

INTRODUCCIÓN

El pan es uno de los alimentos más importantes en nuestro país. La producción nacional, en 1998, alcanzó los 2,7 millones de toneladas y demandó cerca del 73 % del consumo interno de harinas. El 95 % de la elaboración es efectuada por pequeñas y medianas panaderías artesanales, y el 5 % restante por grandes empresas industriales que cuentan con tecnología de última generación. Mientras que el consumo de pan tradicional se encuentra en disminución, el industrial presenta un fuerte aumento dado el carácter menos perecedero de este tipo de producto y el cambio en los hábitos de compra de la población (Pantanelli 1999).

En el mundo se desecha gran cantidad de productos panificados porque endurecen, esto representa una importante pérdida económica. Una de las estrategias que ha empezado a utilizarse para disminuir dichas pérdidas en la congelación de las masas, ya que este proceso permite ofrecer al consumidor permanentemente un producto recién elaborado. Esta tecnología se aplica tanto a la producción de pan fresco, como a la elaboración de facturas, panes de Viena, hamburguesas entre otros. En este sistema de elaboración la producción de las piezas de masa es centralizada en tanto que la etapa de horneado es descentralizada en pequeños comercios próximos al consumidor, lo que permite brindar pan fresco en todo momento (Kulp et al 1995).

En el ámbito industrial, en este proceso el amasado del pan se realiza de la misma manera que se hace para la elaboración de pan fresco, luego la masa se deja relajar, se forman las piezas y en ese momento se congela a -18°C y se realiza la distribución. En los puntos de ventas, a medida que el producto se consume, se realiza la fermentación en piezas y el horneado (Frida Alimentaria 1996, Cobopa 1996).

Desde el punto de vista económico los productos panaderos congelados presentan el inconveniente que deben ser transportados y mantenidos a -18°C hasta el final del proceso.

Al ser la congelación una aplicación novedosa en los productos de

panificación, el estudio sobre los cambios que se producen durante el proceso y las causas que provocan dichos cambios, es muy incipiente restando aún mucho por conocer (Stauffer 1993).

La masa congelada es un sistema complejo más sensible al cambio de los ingredientes y a las condiciones de proceso que el sistema de elaboración de masa tradicional. Almacenamientos prolongados provocan pérdida en la calidad de los productos.

Otras de las estrategias usadas para disminuir las pérdidas por endurecimiento de los productos de panadería, es el uso de productos parcialmente horneados. Después que estos productos pasan por las etapas de amasado y fermentación, son horneados en forma parcial, sin llegar a tomar color. Seguidamente, son congelados o refrigerados, y repartidos a los lugares de venta. El tiempo de precocción varía desde el 30 al 85 % del tiempo de horneado total en el proceso tradicional de elaboración de pan. En los lugares de venta, se debe completar la etapa de horneado.

En este método de elaboración las piezas de masa precocidas no necesitan fermentación previa al horneado, que es un gran problema en masas congeladas, y por lo tanto no sufren los procesos de deterioro que afectan a las levaduras y a la estructura del gluten. A pesar de ello, los productos obtenidos a partir de masas precocidas poseen una vida útil más corta, ya que el doble proceso de horneado provoca una mayor pérdida de humedad.

Entre los problemas descritos en las masas congeladas se destaca la producción de panes con menor volumen, mayores tiempos de fermentación y mayor deterioro de la textura final (Wolt y D'appolonia 1984a, Dubois y Blockolsky 1986, Neyreneuf y Van Der Plaat 1991, Inoue y Bushuk 1992, Rasanen et al 1997a, Ribotta et al 2001). Estos problemas deben ser solucionados para que esta tecnología sea ampliamente utilizada, para lo cual se requiere de un profundo conocimiento de los cambios producidos a nivel estructural y

fisicoquímico de los distintos componentes que forman parte de la masa panaria.

Harina de trigo

Existen muchos tipos de trigo, pero tres son los más importantes comercialmente. El trigo común o pan (*Triticum aestivum* (L) Thell. subesp. *aestivum*) es el más ampliamente cultivado. La característica principal de esta especie es que produce harina de calidad superior para elaborar productos leudados, como pan, galletitas tipo “crackers”, masa para pizza, pan dulce y otros productos que requieran una masa muy elástica y extensible. La mayor parte del trigo pan es utilizado para la producción de harina para pan, pero algunas variedades han sido desarrolladas para la elaboración de bizcochuelos, tortas y galletitas dulces. El trigo club (*T. Aestivum* (L) Thell. subesp. *compactum* (Host) MacKey), cultivado en Estados Unidos y Canadá, posee granos blandos y con bajo contenido de proteína. Esta especie no produce harinas aptas para elaborar pan, en cambio son de gran calidad para ciertos tipos de tortas y productos de pastelería, donde se necesita un bajo nivel de proteína y un gluten débil. El tercer tipo, es el trigo duro (*T. Turgidum* (L) Thell. conv. *durum* (Desf.) MacKey) (MacKey 1975). Las variedades de granos rojos son cultivadas en muy poca cantidad y se usan para alimento de ganado. La principal producción es de variedades blancas, que producen un grano muy duro y con altos porcentajes de proteína. La mayor parte de la cosecha de trigo duro se utiliza para obtener harinas y semolinas usadas en la producción de pastas, ya que no es apta para elaborar pan (Zeleny 1971). La composición del trigo puede variar según el área y el año de cosecha. La Tabla 1 muestra los rangos típicos de la composición de muestras de trigo.

La harina de trigo es la única que tiene la habilidad de formar una masa cohesiva y fuerte capaz de retener gases y dar productos aireados y livianos después de su horneado. Esta propiedad que la identifica se debe a su composición química, y en especial a las proteínas y su capacidad para formar gluten.

Tabla 1. Rango de variación en la concentración de los principales componentes del trigo (Matz 1999a).

Componentes	Composición química del trigo (%)	
	Mínimo	Máximo
Proteína	7,0	18,0
Cenizas	1,5	2,0
Lípidos	1,5	2,0
Almidón	60,0	68,0
Fibra cruda	2,0	2,5
Humedad	8,0	18,0

Proteínas

Las proteínas de los granos de trigo se pueden dividir en dos grandes grupos: las proteínas del gluten y aquellas que no forman gluten. Las primeras se denominan proteínas de almacenamiento y constituyen alrededor del 75-80 % del total de proteínas. Entre las proteínas no formadoras de gluten, que representan el 20-25 % del contenido total de proteínas, se encuentran la mayoría de las enzimas.

Osborne, en 1907 clasificó a las proteínas de los cereales de acuerdo a su solubilidad en cuatro tipos: albúminas, solubles en agua; globulinas, insolubles en agua y solubles en soluciones salinas diluidas; prolaminas, insolubles en agua y en soluciones salinas y solubles en alcohol al 70 % y glutelinas, insolubles en los solventes anteriormente mencionados y solubles en ácidos diluidos. Estas últimas también pueden ser solubilizadas en bases diluidas y detergentes. A los dos primeros grupos pertenecen las proteínas metabólicamente activas que se ubican en el citoplasma celular. Las gliadinas y gluteninas comprenden las proteínas de almacenamiento las cuales conforman la mayoría de las proteínas presentes en el gluten.

Más recientemente, han sido desarrollados otros procedimientos de solubilización de las proteínas del trigo, con dodecil sulfato de sodio (SDS), TRIS/SDS, buffer fosfato/SDS (Graveland et al 1979, Bottomley et al 1982, Ng y Bushuk 1987, Larroque et al 2000). Todos estos procedimientos de fraccionamiento conducen a un solapamiento de las distintas fracciones.

En los cereales las albúminas y las globulinas están concentradas en el germen, el salvado y las células de la capa de aleurona y se encuentran en una menor concentración en el esdosperma. Estas proteínas poseen un buen balance de aminoácidos, contienen proporciones relativamente altas de lisina, triptofano y metionina; tres aminoácidos que se encuentran en baja proporción en la mayoría de los cereales.

La fracción de albúminas y globulinas incluye las proteínas solubles en cloroformo - metanol (CM-proteínas), enzimas, albúminas de masa molecular alta (HMW-albúminas), proteínas “triples” y otras que no son proteínas de almacenamiento. Algunas de estas proteínas solubles han sido encontradas en gluten preparado por lavado del almidón de una masa. Por ejemplo, la fracción del gluten de masa molecular baja, denominada proteínas S, también fue encontrada en la fracción de albúminas/globulinas preparadas por el procedimiento de Osborne (Zawistowska et al 1985). Esta fracción de proteínas afecta el proceso de elaboración de pan y de pasta, la cantidad de albúminas con capacidad de agregación fue correlacionada negativamente con la calidad del pan, mientras que a las proteínas S que tienen afinidad por los lípidos polares, se las ha asociado a la mejora del volumen del pan (Pogna et al 1994).

Las CM-proteínas poseen masas moleculares entre 11,0-13,0 kDa, y una composición de aminoácidos única con altos valores de lisina y aminoácidos no polares. Las proteínas “triples” o “triticins” son proteínas menores del endosperma depositadas en cuerpos proteicos que aparecen en geles SDS-PAGE como un triplete de bandas de HMW en fracciones no

reducidas. Por reducción se obtienen cuatro subunidades de 58,0; 52,0; 23,0 y 22,0 kDa respectivamente (Singh et al 1991).

Mediante el fraccionamiento de las albúminas de harina de trigo por SDS-PAGE aparecen numerosos componentes proteicos. La mayoría de estas proteínas se pueden dividir en dos grupos: HMW-albúminas, y LMW-albúminas con un peso molecular aproximado de 60,0 y de 14,0-16,0 kDa respectivamente (Pogna et al 1994).

Las plantas almacenan proteínas bajo la forma de prolaminas y glutelinas, las que sirven como fuente de nitrógeno durante la germinación de las semillas. Estas proteínas se encuentran sólo en el endosperma. En trigo, la composición de las glutelinas es similar a la de las prolaminas y se caracteriza por altas concentraciones de glutamina, un tercio o más del residuo total de aminoácidos, y de prolina, una séptima parte o más del residuo total de aminoácidos.

Los términos gliadinas y gluteninas son usados comúnmente para designar las proteínas de almacenamiento del trigo, aunque Osborne sugirió los nombres genéricos, prolaminas y glutelinas, para las fracciones equivalentes de otros cereales (Kasarda et al 1976).

Las gliadinas constituyen una mezcla de componentes proteicos de composición similar, solubles en etanol al 70 %. Mayormente, son proteínas monoméricas responsables de la viscosidad del gluten. Cerca de un tercio de las proteínas de la harina son gliadinas (Lindahl 1990). Este grupo rico en prolina y glutamina tiene un bajo nivel de aminoácidos cargados. Mediante electroforesis a pH ácido (Jones et al 1959, Woychik et al 1961) han sido clasificadas en α -, β -, γ - y ω -gliadinas, abarcando cada grupo más de un tipo de proteínas, ya que se han identificado alrededor de 40 especies polipeptídicas distintas. Las ω -gliadinas no contienen residuos de cisteína, por lo que están limitadas para formar interacciones covalentes en la masa (Tatham 1995). Las α -, β - y γ -gliadinas poseen enlaces disulfuro intramoleculares, por lo que no son capaces de formar nuevos enlaces covalentes y tomar parte en la formación de la red de

gluten. Sin embargo, estos enlaces disulfuro son importantes para retener el plegado de la estructura que determina la naturaleza de las interacciones no covalentes (Wrigley et al 1998). Sus masas moleculares se encuentran comprendidas entre 30,0 y 200,0 kDa. Las fracciones de mayor masa molecular (100,0 a 200,0 kDa) están compuestas de subunidades más pequeñas (Bietz y Wall 1980). Las ω -gliadinas tienen una masa molecular entre 60,0-80,0 kDa, mientras que las restantes están en un rango comprendido entre 30,0-40,0 kDa (Bietz 1979). Las gliadinas pueden también ser divididas por su hidrofobicidad mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC): las γ -gliadinas son el grupo más hidrofóbico (Wieser et al 1987). Las α -, β -, y γ -gliadinas contienen un 30-35 % de su estructura en α -hélice. Las α -gliadinas también contienen 10 % de lámina β , mientras que las ω -gliadinas no contienen este tipo de estructuras, pero son ricas en giro β (Tatham et al 1985).

Se acepta que las prolaminas son las encargadas de impartir la extensibilidad a la masa, las gliadinas purificadas e hidratadas tienen poca elasticidad y son escasamente cohesivas (Wall 1979).

Las gluteninas constituyen la parte menos soluble de las proteínas totales de la harina de trigo (Kasarda et al 1976). Representan el 45 % del contenido de proteínas totales de la harina de trigo (Lindahl 1990) y se encuentran formando agregados proteicos unidos por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes intermoleculares cuyas masas moleculares alcanzan varios millones de daltons y determinan la fuerza y la elasticidad del gluten. Las subunidades resultantes de la reducción de los puentes disulfuro muestran propiedades similares a las gliadinas y pueden ser divididas en dos tipos, las subunidades de alta masa molecular (HMW) y las de baja masa molecular (LMW) (Wieser 2000). Payne y Corfield (1979) encontraron que, de acuerdo a su movilidad en geles SDS-PAGE, las gluteninas están formadas por tres grupos de subunidades denominados A, B y C. El primer grupo con masa molecular aparente entre 95,0-136,0 kDa (gluteninas de masa molecular alta, HMW); el segundo entre 42,0-

51,0 kDa, y el último entre 31,5-35,5 kDa. Los grupos B y C corresponden a las gluteninas de baja masa molecular (LMW).

Las gluteninas también pueden ser separadas por RP-HPLC, encontrándose en este caso aproximadamente 20 subunidades diferentes. Estos componentes fueron eluidos en tres grupos principales y están formados por subunidades de masa molecular media, alta y baja respectivamente (Seilmeier et al 1987).

De acuerdo a su secuencia de aminoácidos y a su movilidad electroforética las subunidades de HMW-gluteninas se han subdividido a su vez en dos tipos: tipo-x y tipo-y, de baja y alta masa molecular respectivamente. Estas difieren en su dominio N-terminal y sus motivos repetitivos (Tatham 1995).

Las LMW-gluteninas son similares a las gliadinas en composición, masa molecular y solubilidad, lo que ha causado una considerable confusión sobre la identidad de gliadinas y gluteninas (Huebner y Bietz 1993). Este grupo de proteínas también ha sido denominado gluteninas reducidas solubles en alcohol, HMW-gliadinas, gluteninas tipo III o agregados de gliadinas. Algunas existen como heteropolímeros junto con las subunidades de HMW-gluteninas (Pogna et al 1994).

A las gluteninas, sobre todo de masa molecular alta, se les asigna la capacidad de conferir a la masa las propiedades viscoelásticas, debido a la repetición de estructuras tipo giro β . Esto sugiere una forma de espiral β como estructura predominante con grandes semejanzas a la elastina. En base a este modelo se pueden agregar muchas moléculas para formar fibrillas elásticas estabilizadas por puentes hidrógeno, en los que participan los residuos de glutamina de las cadenas laterales, y por interacciones hidrofóbicas entre residuos aromáticos, fundamentalmente de tirosina (Tatham et al 1985).

Las prolaminas del trigo han sido también clasificadas, sobre la base de su secuencia de aminoácidos, en tres grupos: i) HMW-prolaminas (incluyen las HMW-gluteninas), ii) las prolaminas pobres en azufre (ω -

gliadinas), y iii) las prolaminas ricas en azufre (α -, β -, γ -gliadinas y las LMW-gluteninas) (Tatham et al 1985, Tatham 1995). Esta nomenclatura no responde precisamente a la clasificación en gliadinas y gluteninas, basada en la capacidad para formar puentes disulfuro intermoleculares, ya que las prolaminas ricas en S se encuentran distribuidas en los dos grupos. Por el contrario, las prolaminas pobres en S y las HMW-prolaminas sólo están presentes en las fracciones de gliadinas y gluteninas, respectivamente.

Carbohidratos

Los carbohidratos se forman a partir de dióxido de carbono y agua mediante la fotosíntesis. Estos sirven como estructura de soporte en la planta y la semilla, son la fuente de energía para muchas de las reacciones metabólicas y son depositados en la semilla para suministrar energía durante el desarrollo de la nueva planta.

Los mono y disacáridos se encuentran en el grano en muy pequeñas cantidades, fructosa 0,06 %, glucosa 0,08 %, galactosa 0,02 %, sacarosa 0,54 % y maltosa 0,05 % (porcentajes de materia seca). Los oligosacáridos también se encuentran en muy bajas proporciones, por ejemplo la rafinosa en un 0,19 % (Hoseney 1994e, Matz 1999a).

Los granos de cereales almacenan energía en forma de almidón. El almidón es el carbohidrato que se encuentra en mayor cantidad en el grano de trigo maduro, representando entre el 65-70 % de la harina de trigo (con una tasa de extracción del 80 % y una humedad del 14 %). El almidón se acumula en forma de gránulos y estos se forman dentro de los amiloplastos. En los cereales que tienen gránulos simples (trigo, maíz, centeno, cebada, sorgo y mijo) cada amiloplasto contiene un gránulo. En el caso del arroz y la avena, que poseen gránulos compuestos, cada amiloplasto está constituido por muchos gránulos. Los gránulos de almidón en la harina de trigo y de otros cereales muestran una distribución de tamaño bimodal, los gránulos más pequeños (tipo-B) son

esféricos con un diámetro menor a 10 μm en tanto que los grandes (tipo-A) son lenticulares con un diámetro cercano a 20 μm . El interior de los gránulos está formado por regiones cristalinas y amorfas alternadas por lo que el almidón es descrito como un polímero semicristalino o parcialmente cristalino (Eliasson y Gudmundsson 1996). El gránulo de almidón está compuesto esencialmente por polímeros de α -D-glucanos y pequeñas cantidades de constituyentes no glucídicos: lípidos y proteínas. Estos componentes, aunque son componentes menores, pueden afectar las propiedades funcionales del almidón, dadas esencialmente por los dos carbohidratos de mayor masa molecular, amilosa y amilopectina. La amilosa es definida como una molécula lineal compuesta de α -D-glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos α -(1-4), aunque se ha establecido que algunas moléculas son ramificadas a través de enlaces α -(1-6) (Buleón et al 1998). El segundo componente es la amilopectina, polímero altamente ramificado con masas moleculares mayores a 10^8 , la cadena principal está formada por α -D-glucopiranosas unidas por enlaces α -(1-4) y eslabonadas con cientos de pequeñas cadenas con enlaces α -(1-6) en los puntos de ramificación. El enlace α -1,4 imparte a la molécula un giro natural, con lo que la conformación de las cadenas es helicoidal (Greenwood 1976, Hosney 1994c). Dentro del gránulo se puede diferenciar una zona con cierto grado de cristalinidad debido a regiones ordenadas de cadenas de amilopectina y una zona amorfa compuesta principalmente por las regiones ramificadas de la amilopectina y las cadenas de amilosa. La zona cristalina del almidón puede generar tres tipos de estructuras por difracción de rayos-X: tipos A, B y C. El almidón de los cereales presenta estructura tipo A (Zobel 1988b).

Los gránulos de almidón, debido a su estado nativo parcialmente cristalino, experimentan cuando son sometidos a tratamiento térmico distintas transiciones de fase, llamadas gelatinización y retrogradación, (Belitz y Grosch 1999c).

La matriz proteína - almidón y el tamaño de los gránulos de almidón en el grano de trigo tienen importancia en los procesos de molienda y de elaboración de productos de panificación.

Otros polisacáridos, distintos del almidón, también se encuentran en las paredes celulares de los tejidos parenquimáticos y lignificados de la planta de trigo. Estos componentes son arabinoxilanos y β -D-glucanos solubles, además de pequeños porcentajes de celulosa y glucomananos. El endosperma del grano de trigo tiene cantidades relativamente altas de arabinoxilanos y muy bajas de β -D-glucanos. Las paredes celulares de las capas de salvado de los granos tienen una apreciable cantidad de celulosa y arabinoxilanos.

Los arabinoxilanos se clasifican en solubles e insolubles en agua basándose en el grado de ramificación de la arabinosa en el esqueleto de xilosa, una mayor ramificación da lugar a una mayor insolubilidad. Estos carbohidratos presentes en la harina de trigo se agrupan bajo el nombre de pentosanós, y a pesar de ser un componente minoritario ha sido muy estudiado debido a su contribución a la calidad de los productos panificados por su naturaleza altamente hidrofílica (D'Appolonia y Rayas-Duarte 1994).

Componentes minoritarios

En el grano de trigo se encuentran presentes distintos tipos de lípidos, tales como ácidos grasos, glicéridos simples, galactoglicéridos, fosfoglicéridos, esteroides, esfingolípidos, dioles, tocoferoles, carotenoides e hidrocarburos. Los lípidos tipo acil son los que se encuentran en mayor proporción; entre ellos predominan los triglicéridos que contienen ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y α -linolénico, encontrándose los mono y diglicéridos en menor proporción.

El endosperma del grano de trigo contiene muy poca cantidad de fibra, entendiéndose como tal, todos los componentes remanentes de las células vegetales resistentes a la hidrólisis por las enzimas participantes

del proceso de digestión, que incluye a polisacáridos no digeribles y ligninas. La harina de trigo blanca, que contiene algunas de las capas externas del grano, y la harina de trigo entera, que contiene todas las fracciones en la misma proporción que en el grano, son buenas fuentes de fibra. La harina blanca, la harina entera y el salvado de trigo contienen, en promedio, 2,8 %, 15,6 % y 42,7 % de fibra dietaria (sobre materia seca) respectivamente. Los minerales también están en muy pequeña proporción en el grano de trigo, siendo aún menor su presencia en el endosperma (menos que el 1 %). Los componentes mayoritarios de esta fracción son los fosfatos y sulfatos de potasio, magnesio y calcio. También se encuentran cantidades significativas de hierro, magnesio, zinc y cobre (Matz 1999a).

Todas las reacciones que conforman el metabolismo de los vegetales son catalizadas por enzimas. En el grano intacto, seco y no germinado la actividad enzimática total es muy baja, pero cambia drásticamente cuando comienza la germinación. Las enzimas que han recibido mayor atención son las amilolíticas, o enzimas que digieren el almidón, debido a que los efectos de estos catalizadores biológicos son muy importantes en la etapa de horneado y en la elaboración de malta y cerveza. Las principales enzimas hidrolíticas que actúan sobre los carbohidratos presentes en los cereales son α - y β -amilasas, enzimas desramificantes, celulasas, β -gluconasas y glucosidasas. El trigo contiene también un gran número de enzimas proteolíticas, tanto endopeptidasas (cortan enlaces peptídicos a determinada distancia desde los extremos de las moléculas de proteínas) como exopeptidasas (atacan los extremos carboxílicos o amínicos de las proteínas). Otro grupo importante de enzimas son las lipasas, estearasas y fosfatasas; las dos primeras se diferencian en su capacidad para hidrolizar ésteres carboxílicos a partir de moléculas insolubles o solubles en agua, respectivamente; mientras que las fosfatasas actúan sobre ésteres del ácido fosfórico. Otras enzimas presentes en el grano de trigo son las fitasas, que catalizan la hidrólisis de ácido fítico a inositol y ortofosfato libre; las lipooxigenasas, que aceleran la

peroxidación de ciertos ácidos grasos insaturados por el oxígeno; las polifenoloxidasas, que oxidan los fenoles a quinonas. Estas últimas enzimas se encuentran relativamente más concentradas en el salvado que en el endosperma, al igual que las hidroperoxidasas (peroxidadasas y catalasas) que catalizan la oxidación de ciertas aminas aromáticas y fenoles por peróxido de hidrógeno (Hoseney 1994e, Matz 1999a).

Gluten

Las propiedades de la harina de trigo para formar una masa cohesiva que puede ser horneada para producir pan o para formar pastas son derivadas de las proteínas presentes en el gluten. Consecuentemente, las proteínas del trigo han sido el grupo de proteínas vegetales más estudiado desde que Beccari, en 1745, informó acerca del aislamiento del gluten. A pesar de los numerosos estudios realizados sobre la estructura de las proteínas del gluten y la base molecular existente, su rol en el procesamiento del pan aún no es totalmente comprendido (Shewry et al 2001).

El gluten es definido como un gel formado por las proteínas de almacenamiento del grano de trigo cuando se trabaja mecánicamente una mezcla de harina y agua. Se puede obtener lavando masa con agua para eliminar el almidón y los componentes solubles, según como se obtenga presenta un 80 % de proteínas y 8 % de lípidos, base sustancia seca, con un resto de carbohidratos y cenizas (Eliasson y Larsson 1993c, Hoseney 1994d).

Las proteínas que integran el gluten se encuentran localizadas en cuerpos proteicos en el endosperma del grano; durante el amasado se produce la ruptura de estos cuerpos y su hidratación formando una red tridimensional continua en donde se encuentra embebido el almidón. Las interacciones de tipo covalentes y no covalentes entre los polipéptidos más grandes que forman la masa producen una matriz elástica y extensible.

No se conoce con exactitud por qué las proteínas de la harina interactúan para formar una masa con propiedades viscoelásticas. Los elementos estructurales responsables de esta propiedad particular son los puentes disulfuro, interacciones iónicas e hidrofóbicas y secuencias ricas en glicina (Belitz et al 1986). Tanto los enlaces covalentes, puentes disulfuro intermoleculares, como las interacciones no covalentes son importantes en la formación y el comportamiento de la masa (Ng et al 1991).

Las proteínas del gluten sólo poseen bajos niveles de cargas positivas potenciales. Esto significa que las fuerzas de repulsión entre las proteínas son bajas y consecuentemente, las cadenas polipeptídicas pueden interactuar fácilmente entre sí, una condición que parece necesaria para la formación de la masa. Un análisis de la composición de las proteínas del gluten muestra que aproximadamente la mitad de los aminoácidos constituyentes son glutamina y prolina. La densidad de carga de estas proteínas es extremadamente baja, con pequeños niveles de aminoácidos básicos y, prácticamente, con todos los grupos ácidos en forma de amidas. Ambos hechos hacen pensar en la existencia de una gran cantidad de enlaces hidrógeno en el sistema. Otro aporte importante son las interacciones hidrofóbicas, ya que aproximadamente el 35 % de los aminoácidos poseen cadenas laterales de naturaleza hidrofóbica (Hoseney 1994d).

Las propiedades de la masa son gobernadas por la estructura del gluten y las interacciones que se establecen entre las proteínas que lo componen, particularmente entre los macropolímeros de gluteninas unidos por enlaces disulfuro (Lindsay y Skerritt 1999). Se conoce que las HMW-gluteninas confieren elasticidad al gluten, pero el mecanismo por el cual se produce este efecto no es claro (Belton 1999).

La estructura de los polímeros de gluteninas no es totalmente conocida debido a sus grandes dimensiones, incluso su tamaño no ha sido establecido con certeza (Wrigley 1996). La ruptura de los agregados resulta en la liberación de oligómeros y dímeros de composición definida,

lo que sugiere que los macropolímeros están compuestos de unidades oligoméricas de composición específica (Lindsay y Skerit 1999). Se han propuesto numerosos modelos para describir la estructura polimérica de las gluteninas. Kasarda et al (1976) propusieron un modelo en el que las gluteninas sólo presentaban enlaces disulfuro intracatenarios, los cuales fuerzan a las proteínas a adquirir conformaciones específicas que facilitan la interacción de moléculas de gluteninas a través de enlaces no covalentes, causando agregación. Si estas conformaciones específicas no se mantienen es imposible que se produzca la agregación a través de fuerzas secundarias. Ewart (1979) propuso un modelo alternativo basado en un arreglo lineal de subunidades de gluteninas que contenían fundamentalmente puentes disulfuro intracatenarios y sólo dos uniones intercatenarias. Posteriormente este modelo fue revisado a efectos de explicar la acción de los agentes reductores sobre la masa y se sugirió la existencia de un enlace disulfuro entre cadenas lineales. Khan y Bushuk (1979) propusieron otro modelo en el que la matriz de gluten estaba formada por gluteninas agregadas a través de enlaces disulfuro intra e intercatenarios e interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas). Graveland et al (1985) propusieron a su vez un modelo ramificado para los polímeros que forman el gluten. En el mismo las subunidades de HMW-gluteninas tipo-x e -y se encuentran unidas vía cabeza - cola a través de puentes disulfuro formando la columna vertebral del polímero. Por su parte, las LMW-gluteninas, integrando grupos ("cluster"), se encuentran unidas por puentes disulfuro a las subunidades HMW de la cadena lineal, formando los puntos de ramificación. Gao et al (1992), sugirieron que los macropolímeros de gluteninas están formados por unidades oligoméricas estabilizadas por puentes disulfuro sensibles a la reducción o al daño mecánico. Lindsay y Skerit (1999) propusieron un modelo con tres niveles de organización, el primero está constituido por la estructura que constituye la columna vertebral del polímero que contiene sólo subunidades de gluteninas (predominantemente gluteninas de HMW) capaces de formar al menos dos enlaces disulfuro. El segundo nivel de organización comprende las

subunidades de gluteninas capaces de formar al menos dos enlaces disulfuro intercatenarios, especialmente subunidades de LMW y HMW gluteninas. Estas proteínas estarían unidas a las subunidades de HMW-gluteninas tipo-y (tienen tres residuos adicionales de cisteína respecto de las tipo-x, uno de los cuales es capaz de formar enlaces intermoleculares) de la columna vertebral del polímero formada por HMW, originando los puntos de ramificación. El nivel final de organización está integrado por LMW-gluteninas (las que poseen un número impar de residuos de cisteína) terminadoras de cadena en la periferia de las ramificaciones.

Las interacciones entre las cadenas de los polímeros de gluteninas dentro de la matriz del gluten y entre estas cadenas y los monómeros de gliadinas son, junto a la estructura de los polímeros, críticas en el comportamiento de la masa. Estas interacciones son poco comprendidas a nivel molecular (Lindsay y Skerrit 1999).

La existencia de mecanismos de entrecruzamiento en masa pueden explicar la resistencia a la extensión. La presencia de puentes disulfuro está claramente establecida y puede explicar la plasticidad de las masas pero no su elasticidad. Después de la ruptura de estos enlaces por la extensión de la masa no existe un mecanismo que reestablezca las dimensiones originales del material. Se pueden formar nuevos enlaces, pero serán el resultado del movimiento al azar y de la alineación producida por la extensión de las entidades que contengan grupos disulfuro (Belton 1999).

En los últimos años se han presentado dos teorías para explicar la naturaleza elástica del gluten. MacRitchie y Lafiandra (1997) propusieron que los polímeros dentro del gluten forman puntos de entrecruzamiento ("entanglement"). En este modelo, pequeñas áreas de los polímeros interactúan formando superficies de enredo, separadas por regiones largas que no interactúan. Las propiedades de extensión de la masa pueden explicarse en dos etapas: en la etapa inicial de extensión las cadenas enrolladas formadas por subunidades de gluteninas son estiradas, debido a la ruptura de las interacciones secundarias dentro de las cadenas de los

polímeros. Una vez extendidas, un estiramiento adicional produce el desenredo de los puntos de enredo. Este modelo explica las diferencias en la extensibilidad de las masas por medio de la capacidad de las cadenas poliméricas para estirarse y en el desenredo de los puntos de entrecruzamiento.

Más tarde, Belton (1999) propuso un modelo que puede explicar mejor la elasticidad del gluten. En este trabajo se asume que las proteínas aisladas pueden ser representadas como una cadena larga formada por una secuencia de motivos repetitivos que adquieren una conformación de varilla. Esta sección posee una alta densidad de grupos capaz de originar puentes hidrógeno. Los dominios terminales de las cadenas polipeptídicas tienen una estructura similar a las proteínas globulares y contienen la mayoría de los residuos de cisteína. Este investigador describe al gluten formado por una estructura de bucles y colas, “loop and train”, regiones donde existen interacciones polímero - solvente y regiones con interacciones polímero - polímero, respectivamente. En este modelo las proteínas del gluten son estabilizadas por interacciones no covalentes en paralelo. El estiramiento de los polímeros produce primero la deformación de los bucles, “loops”, y, posteriormente, de las colas, “train”, mientras que las interacciones no covalentes son rotas (Figura 1). Sin embargo, puede producirse la restauración del equilibrio de bucles y colas resultando en la relajación de la estructura del polímero. La fuerza de restauración consistirá de un término entrópico asociado con la entropía conformacional de los bucles y con la entalpía de formación de puentes hidrógenos en las colas, la pérdida de entropía resultante de la formación de estos enlaces será compensada, en parte, por el aumento de entropía del agua liberada que se encontraba ligada por enlaces hidrógeno.

Las asociaciones no proteicas que pueden afectar la reología y la estabilidad del gluten están poco definidas. Estas incluyen complejos proteína - lípido no covalentes, enlaces covalentes con hemicelulosas presentes en la harina, y posiblemente con otros oligosacáridos, e

interacciones secundarias con la superficie de los gránulos de almidón (Chung et al 1979, MacMaster y Bushuk 1983).

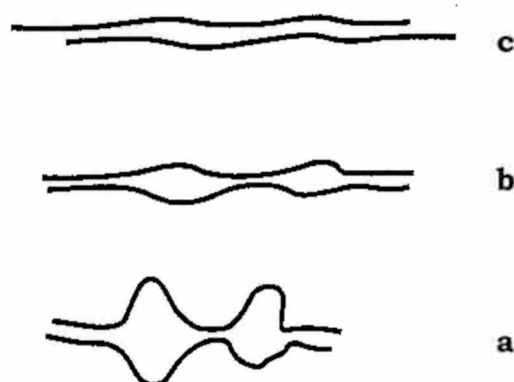


Figura 1. Deformación de los polímeros causada por el estiramiento de la red proteica. a) Configuración de equilibrio, zonas de bucles y colas, “loops and trains”. b) Pequeña extensión de la red, sólo las regiones de bucles son deformadas. c) Gran extensión de la red, las regiones de bucles son aplastadas y los puentes hidrógeno se rompen permitiendo que las cadenas se deslicen unas sobre otras.

La harina provee el principal ingrediente estructural en las masas congeladas. En este proceso la estructura del gluten y la integridad de la masa son sometidas a tensiones físicas cuando se la congela y descongela, por lo que las masas congeladas elaboradas con harinas de alta calidad panadera, es decir harinas fuertes con buena cantidad y calidad de proteínas, producen mejores resultados (Neyreneuf y Van Der Plaat 1991, Inoue y Bushuk 1992).

Numerosos estudios (Hosomi et al 1992, Inoue et al 1995, El-Hady et al 1999, Sahlstrom et al 1999, Kenny et al 2001) han sugerido que las modificaciones en la formulación de los productos panaderos pueden ayudar a corregir defectos que se producen durante la congelación de la masa. Las formulaciones complejas son más tolerantes a los efectos de la

congelación que las simples. Altos niveles de azúcar y de lípidos incrementan la estabilidad del agua libre de los productos, debido a que minimizan la recrystalización del hielo y reducen la cantidad de agua drenada por las levaduras durante el período de congelación (Casey y Foy 1995). Las masas congeladas son suplementadas normalmente con niveles elevados de oxidantes (ácido ascórbico, azodicarbonamida y bromato de potasio) para compensar los efectos nocivos de la congelación sobre la estructura del gluten (Hsu et al 1979a, Wolt y D'Appolonia 1984b, Nemeth et al 1996).

También se utilizan agentes emulsionantes como el monoglicérido del ácido diacetil-tartárico (DATEM) y el estearoil lactilato de sodio (SSL). Estos aditivos son utilizados en masas congeladas para producir un refuerzo de la matriz de gluten y minimizar las pérdidas de volumen en la pieza, sin embargo ejercen poco o ningún impacto sobre la tolerancia de la levadura a la congelación (Wolt y D'Appolonia 1984b, Kenny et al 2001).

Levaduras

Las levaduras son organismos vivos que están inactivos durante su almacenamiento. Esta inactividad es causada por el proceso de secado, en el caso de la levadura seca activa, o por la acción de temperaturas bajas, en el caso de la levadura comprimida. Las levaduras comerciales están normalmente acompañadas por bacterias, principalmente lactobacilos, que son importantes en la producción de galletitas tipo “crackers” y de masa madre, pero no parecen ser importantes en el proceso tradicional de elaboración de pan (Hoseney 1994b).

Cuando las levaduras son incorporadas a la masa, se logran las condiciones adecuadas para su activación. Las levaduras pueden crecer bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas, la reproducción de las células y la fermentación en las primeras etapas de la elaboración de cerveza son procesos aeróbicos, mientras que la fermentación del pan es un proceso anaeróbico dado que el oxígeno en la masa es rápidamente consumido, a

menos que se agregue oxígeno al sistema (por ejemplo reamasando los ingredientes). Por consiguiente, en este último proceso las células crecen poco.

Durante la fermentación los gases son generados como parte de la actividad metabólica de las levaduras. Muchos microorganismos pueden fermentar azúcares para producir CO₂, pero el organismo que mejor parece funcionar en masas es el *Saccharomyces cerevisiae*. Los principales productos de la fermentación son, en este caso, el CO₂ y el alcohol etílico, resultado de una serie compleja de reacciones controladas por enzimas. Los azúcares simples, como la glucosa y la fructosa, son los sustratos transformados en la fermentación. El dióxido de carbono es el responsable del aumento de volumen de la masa, mientras que el alcohol ayuda a producir el aroma complejo de los productos horneados. Una gran parte de estas sustancias son perdidas durante las etapas de horneado y enfriado del producto. Los azúcares consumidos en la fermentación son productos de la acción enzimática sobre moléculas más complejas, como disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Las reacciones secundarias que acompañan a la fermentación alcohólica proveen pequeñas cantidades de sustancias que ayudan a obtener el sabor y el aroma del producto final. Entre las sustancias identificadas podemos mencionar ácidos (acético), aldehídos y ésteres (Matz 1999b).

Una célula simple de levadura utilizada en el proceso de panificación mide, en promedio, 4-6 µm de ancho y 5-7 µm de largo. Durante la etapa de fermentación crecen como células simples o, a veces, en pares y se reproducen normalmente por mitosis formando células hijas que se separan y siguen su ciclo de vida (Alberts et al 1983, Matz 1999b).

Las masas que se someten al proceso de congelación y, luego son descongeladas y fermentadas no aumentan de volumen en forma apropiada debido a que algunas células de levaduras son dañadas (Matz 1999b). Cuando la levadura comprimida es congelada su capacidad de resistencia a la ruptura celular es sorprendente. Sin embargo, cuando se congela formando parte de la masa es mucho más susceptible al daño, por

razones que no están totalmente aclaradas. En parte puede deberse a las diferencias entre las células en latencia y las metabólicamente activas. Cuando las células están activas, la masa resultante tiene una capacidad de fermentación mucho menor después de unas pocas semanas de almacenamiento en estado congelado (Stauffer 1993).

Además del daño que causa la congelación a la membrana celular, este proceso provoca la liberación de sustancias químicas componentes de las células, particularmente sustancias reductoras, que pueden tener efectos nocivos sobre la estructura del gluten. Kline y Sugihara (1968) postularon que existe una relación entre las células muertas durante el proceso de congelación y el deterioro de la capacidad de retención de CO₂ de la masa durante la etapa de fermentación. Este efecto fue atribuido a la acción de agentes reductores, liberados por las células, sobre la red de gluten (Varriano-Marston et al 1980). El tripéptido glutatión (glutánil - cisteínil - glicina) aislado de levadura deshidratada sería responsable del debilitamiento de la masa, tal como se pudo observar a través de la disminución del tiempo de amasado, aumento de la extensibilidad y una respuesta menor al uso de agentes oxidantes (Ponte et al 1960). Estos efectos sobre la masa son causados por la reacción del grupo sulfhidrilo del glutatión con los disulfuros del gluten, responsables del entrecruzamiento de la red (Belitz y Grosch 1999b).

Las moléculas de glutatión liberadas por las células durante el proceso de congelación, permanecen en general disueltas en la fase líquida alrededor de las células de levadura. La fase líquida en los sistemas congelados es limitada, por lo tanto se producen concentraciones altas de los compuestos reductores que se localizan en el área líquida adyacente a las células. Además, los reactantes tienen poca oportunidad para difundir a toda la masa durante la etapa de descongelación. Es probable que esta reacción afecte la estructura del gluten en zonas localizadas debido a la distribución no uniforme de las sustancias liberadas (Kulp 1995).

Distintos investigadores (Wolt y D'appolonia 1984a, Varriano-Marston et al 1980, Autio y Sinda 1992) observaron que los cambios estructurales en masas congeladas y descongeladas no se encuentran asociados con la liberación de sustancias reductoras de las células de levaduras, aunque proponen una pérdida del grado de entrecruzamiento de la red de gluten. Berglund et al (1991) mostraron que la formación de cristales de hielo en masas no fermentadas y almacenadas por 24 semanas en estado congelado produjo la ruptura de la matriz de gluten y una red proteica separada de los gránulos de almidón.

Pese a que se hallaron evidencias de la liberación de glutatión durante la congelación de células de levadura, el mecanismo preciso por el cual la levadura contribuye a la pérdida de calidad de la masa es aún desconocido (Casey y Foy 1995).

La levadura comúnmente usada para panificación es generalmente susceptible al daño durante el almacenamiento a temperaturas debajo de 0°C y no retiene suficiente capacidad de producción de gas después de este proceso. Las masas congeladas prefermentadas producen panes de baja calidad debido a una pobre capacidad de producción de gas de las células provocada por el proceso de congelación (Hsu et al 1979a, Neyreneuf y Van Der Plaat 1991). Se han encontrado en fuentes naturales varios tipos de levaduras tolerantes al proceso de congelación (Hino et al 1987, Almeida y Pais 1996) y otras se han obtenido por procedimientos naturales de mutación (Nakagawa y Ouchi 1994, Shima et al 1999).

La capacidad de las levaduras de mantener un poder fermentativo máximo a través del proceso de congelación, fenómeno denominado crioresistencia, es afectada tanto por parámetros celulares como tecnológicos.

Varios estudios han señalado a la trehalosa (disacárido no reductor compuesto por dos moléculas de α -D-glucosa ligadas por sus hidroxilos anoméricos) como un importante factor fisiológico relacionado con la crioresistencia de las células de levadura. Este disacárido, que puede acumularse hasta un 20 % del peso seco de la célula, tiene como rol

principal el actuar como un agente protector eficiente para mantener la integridad de la membrana y de la estructura intracelular bajo un rango amplio de tensiones fisiológicas y ambientales, tales como desecación, presión osmótica y cambios de temperaturas (Casey y Foy 1995). La selección y la obtención de cepas con alto contenido de trehalosa derivó en levaduras con alta crioresistencia, aunque no se observó una correlación directa entre la cantidad de trehalosa y la supervivencia de las levaduras después del proceso de congelación (Neyreneuf y Van Der Plaat 1991, Meric et al 1995, Almeida y Pais 1996, Shima et al 1999, Nakagawa y Ouchi 1999). La reserva de este disacárido no es el único factor de protección de las células contra el daño causado por la congelación de la masa, por el contrario este es el resultado de muchos factores cuyos mecanismos son aún desconocidos (Meric et al 1995, Casey y Foy 1995, Van Dijck et al 2000).

Algunas de las estrategias que se han desarrollado para mejorar el desempeño de las levaduras en masas congeladas son modificaciones de diferentes variables durante su cultivo, como la carencia de nutrientes en la fase final de la propagación de las células y la obtención de cultivos a una menor velocidad de crecimiento; cualquiera de estas modificaciones provoca la acumulación de trehalosa en la célula. Otras variables empleadas son la utilización de un cambio repentino de la temperatura de incubación y una aireación fuerte durante el crecimiento, lo que también provoca un aumento de la cantidad de trehalosa intracelular. La crioresistencia también puede incrementarse por el agregado de agentes protectores (moléculas pequeñas que atraviesan fácilmente la membrana celular) como glicerol, dimetil sulfóxido, sacarosa, trehalosa, glucosa, fructosa, metanol, glicina, prolina, galactosa y lactosa (Casey y Foy 1995).

Hsu et al (1979a) encontraron que la tolerancia a la congelación está directamente relacionada con los niveles de proteína de las células, sólo obtuvieron un buen comportamiento en aquellas levaduras que poseían contenidos de proteína mayores al 57 %. Sin embargo, esto se contradice con el hecho que las levaduras con altos porcentajes de proteína tuvieron

mayores velocidades de activación y fermentación antes de la congelación de la masa, factores nocivos para el desempeño de las levaduras (Neyreneuf y Van Der Plaat 1991).

Otras estrategias utilizadas para mejorar el comportamiento de las levaduras en la congelación están relacionadas con el ajuste en los parámetros del proceso de elaboración de los productos panificados. Toda práctica realizada durante la obtención de las levaduras o en el proceso de panificación, que ayude a minimizar la cantidad de prefermentación antes de la congelación, permitirá mejorar el desempeño de las células de levaduras en masas congeladas (Hsu et al 1979a, Hino et al 1987, Neyreneuf y Van Der Plaat 1991, Van Dijck et al 2000). Los efectos nocivos han sido atribuidos a los subproductos formados durante la prefermentación (especialmente el etanol) que hacen a las células menos crioresistentes, aumentando la cantidad de células muertas después de la congelación (Hsu et al 1979a). Por otra parte se ha observado que las células, al ponerse en contacto con la masa, comienzan a movilizar la trehalosa casi inmediatamente. Este metabolismo se produce por activación de la trehalasa durante la prefermentación, lo que posiblemente disminuye la resistencia a la congelación (Van Dijck et al 2000).

La levadura prensada es ampliamente usada en productos elaborados a partir de masas congeladas; para compensar los efectos adversos de la congelación de la levadura se agrega una cantidad extra de levadura a la formulación que varía entre el 50 y el 100 % de los niveles normales (Stauffer 1993). Los sistemas de levaduras líquidas podrían ofrecer ventajas sobre la prensada, ya que es más fácil de dispersar en la masa y de mantener a temperaturas más bajas. Esta característica disminuye la actividad metabólica durante el procesamiento y podría mejorar la crioresistencia (Casey y Foy 1995). Por otro lado, podría esperarse que la levadura seca minimice la prefermentación, debido a un mayor período de retraso. Sin embargo, generalmente se acepta que el secado afecta la estructura y las funciones de la membrana

citoplasmática, incrementando la sensibilidad de las levaduras secas a la congelación (Kline y Sugihara 1968, Wolt y D'Appolonia 1984b).

La levadura prensada debería mantenerse a una temperatura entre 0,5-3,0°C, no más alta, y no debería ser suspendida en agua para reducir el calentamiento por fricción. Además, se podrían lograr mayores beneficios demorando el agregado de la levadura durante el amasado (Dubois y Blockolsky 1986, Neyreneuf y Van Der Plaat 1991).

El método de elaboración de productos de panificación a partir de masa congelada debería disminuir o evitar la prefermentación de la masa, y utilizar, con el mismo fin, amasadoras de alta velocidad. Otro parámetro a tener en cuenta es la temperatura de la masa, que en este tipo de productos debe mantenerse baja, entre 20 y 24°C, para lograr mejoras en el volumen de las piezas horneadas (Neyreneuf y Van Der Plaat 1991). Sin embargo, temperaturas por debajo de 20°C provocan una caída en el desempeño de las masas congeladas, debido a que no permiten un desarrollo total del gluten en los tiempos normales de amasado (Casey y Foy 1995).

Gelatinización y retrogradación del almidón

Gelatinización es un término que describe la serie de eventos irreversibles que ocurren cuando el almidón es calentado en agua. Es necesario un nivel mínimo de agua y una determinada temperatura para que se produzca este fenómeno. Cuando el almidón es colocado en agua a temperatura ambiente absorbe sólo una pequeña cantidad, el gránulo se hincha levemente y su volumen aumenta aproximadamente el 5 %. Este es un proceso exotérmico y reversible, el calentamiento del sistema por debajo de la temperatura de gelatinización no producirá otro cambio. Sin embargo cuando el almidón se calienta a temperaturas mayores se producen cambios irreversibles. La gelatinización involucra la pérdida de la birrefringencia y de la cristalinidad del grano, la hidratación del almidón con hinchamiento de los gránulos, la ruptura de la estructura del

gránulo, el aumento de la viscosidad y la absorción de calor. El desorden de los dominios cristalinos en los gránulos de almidón es el primer paso en la gelatinización. Estos cambios se deben a que el almidón toma gran cantidad de agua y se hincha sustancialmente. A medida que se produce el calentamiento, el gránulo comienza a distorsionarse y se libera almidón soluble al medio. El almidón soluble y la absorción de agua producen el aumento de la viscosidad.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se usa frecuentemente en el estudio de las transiciones de fase del almidón, en sistemas más simples como geles de almidón con distintos contenidos de agua, o en sistemas más complejos como masa de pan. Zeleznak y Hosney (1986), estudiaron como es afectada la retrogradación en geles de almidón y en pan a diferentes contenidos de humedad. Esta técnica también se utilizó para determinar los efectos de los componentes de la harina y los ingredientes de la masa sobre la gelatinización del almidón (Donovan 1977, Giashi et al 1983). Otros investigadores usaron la calorimetría diferencial de barrido para evaluar la cinética de gelatinización del almidón (Zanoni et al 1991), o para determinar los efectos de distintos aditivos sobre la gelatinización y recristalización del almidón (Chinachoti et al 1991, Rao et al 1992).

La Figura 2 muestra una curva típica obtenida por DSC del calentamiento de una mezcla de almidón y agua al 50 % (p/p). Las transiciones de menor temperatura, M1 y M2, reflejan el fenómeno de pérdida de orden de los cristallitos del almidón, inducido por el tratamiento térmico. La endoterma a mayor temperatura, M3, ha sido atribuida a la desorganización del complejo amilosa - lípido (Kugimiya et al 1980, Ghiasi et al 1983, Burt y Russel 1983, Jovanovich et al 1992). La manifestación de M1 y M2 está fuertemente afectada por la temperatura. Para mezclas de almidón/agua conteniendo más de un 60 % (p/p) de agua, se observa una sola endoterma simétrica. Mientras que el tamaño de esta transición (M1) disminuye progresivamente con la reducción del contenido de agua, y simultáneamente se desarrolla la segunda transición (M2) (Donovan 1979, Biliaderis et al 1980).

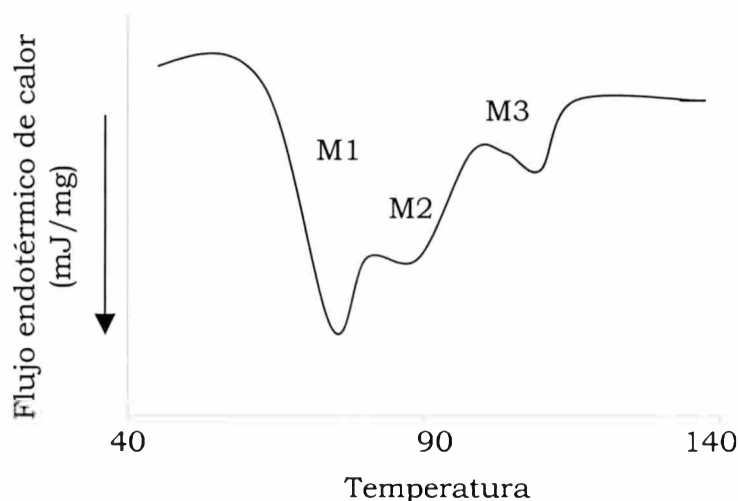


Figura 2. Termograma típico de una mezcla de almidón agua al 50 %.

Se han propuesto muchas explicaciones para el fenómeno de la multiplicidad de picos observados por DSC en almidón granular. Donovan (1979) ha sugerido que las partes amorfas se hidratan e hinchan, y se acoplan a los cristalitos. La fusión de estos últimos se produce en forma cooperativa si el agua está presente en exceso (M1). Sin embargo, cuando el agua comienza a ser insuficiente para que se complete este proceso, los cristalitos remanentes funden a una temperatura más alta (M2) de acuerdo a la teoría de la interacción polímero - diluyente. En consecuencia, la temperatura de la transición M2 comienza a ser dependiente del contenido de agua y de la estabilidad térmica de los cristales remanentes que no fundieron. A niveles de agua mucho menores, M2 es el único proceso observable. Por su parte, Donovan y Mapes (1980) encontraron evidencia que sugiere que las regiones amorfas juegan un rol esencial en el proceso de gelatinización. La absorción de agua y el hinchamiento de estas zonas desestabilizan los cristalitos vecinos, facilitando la remoción de las cadenas de los dominios de los cristalitos. Una explicación alternativa fue dada por Evans y Haisman (1982), quienes

sugirieron que el proceso endotérmico bifásico refleja dos tipos de fusión. Los gránulos que tienen cristalitas menos estables funden primero en forma cooperativa (M1). Durante la fusión, las cadenas de polisacárido absorben más agua, por lo que menos agua queda disponible para los gránulos remanentes no gelatinizados. Esto significa que la concentración efectiva de agua disminuye por repartición. En consecuencia, los gránulos no gelatinizados fundirán a mayor temperatura aún, produciendo un aumento de la transición M2. También se propuso que las endotermas pueden reflejar un proceso secuencial de desenredo dentro de los cristalitas (M1) seguido por transiciones intramoleculares de doble hélices a espiral (M2), para producir una matriz de polisacáridos amorfa totalmente hidratada (Colonna y Mercier 1985).

Por otro lado, Biliaderis (1990) sugirió que dentro de los gránulos parcialmente gelatinizados puede ocurrir un reordenamiento de las cadenas de polímeros en la fase amorfa y en los cristalitas remanentes. Cuando la velocidad de calentamiento es lo suficientemente baja, inmediatamente después de la temperatura de inicio de M1, existe una gran oportunidad de reordenamiento de cadenas en los cristalitas debido al incremento de la movilidad molecular. La estructura de los gránulos cambia a un estado más estable termodinámicamente, aumentando la transición M2, y en consecuencia una fracción menor de cristalitas fundirá a menor temperatura (M1). Si la velocidad de calentamiento aumenta se producirá la fusión de mayor cantidad de cristalitas en M1, debido a que el reordenamiento (recristalización) es un proceso lento. Este comportamiento es menos prominente cuando se aumenta el contenido de agua y la velocidad de calentamiento. En base a lo expuesto, los perfiles térmicos del almidón granular no representan las propiedades originales de los cristalitas sino los efectos compuestos de varios procesos opuestos: fusión parcial, reorganización y fusión final (Biliaderis 1990).

El proceso de gelatinización del almidón es modificado por varios aditivos que se utilizan en la elaboración de masas. Algunos investigadores creen que los solutos de tamaño pequeño, como el azúcar y

la sal, disminuyen la actividad de agua e incrementan la temperatura de gelatinización (Donovan 1977, Spies y Hosene 1992, Kim y Walker 1992, Eliason 1992). Otros autores, por su parte, encontraron que la temperatura y la entalpía de gelatinización primero se incrementan y luego disminuyen con la concentración de sal (Wootton y Bamunuarachchi 1980, Evans y Haisman 1982)

Ghiasi et al (1983) usando calorimetría diferencial de barrido, encontraron una disminución del área del pico I (M1) con respecto al área del pico II (M2) cuando se calentaron mezclas almidón - gluten - agua, almidón - goma xántica - agua y harina de trigo - agua, comparadas con almidón - agua. Esto se debió a que el gluten y la goma actuaron como agentes ligantes de agua, en consecuencia parte del agua no estuvo disponible para la gelatinización del almidón.

Con el tiempo, las moléculas de almidón gelatinizado pueden reasociarse y desarrollar una estructura cristalina. Al mismo tiempo se produce un incremento en la rigidez de la matriz, y una separación del solvente del polímero. Este fenómeno es conocido como retrogradación. Posteriormente se ha reconocido que la retrogradación consiste en dos procesos separables: (a) la gelificación rápida de la amilosa solubilizada durante el enfriamiento, lo que implica la formación de dobles hélices en varios segmentos de las cadenas, y (b) recristalización de la amilopectina en los gránulos gelatinizados a una velocidad mucho menor que la amilosa. También se sugirió que los geles de almidón se deben tomar como compuestos en los cuales los gránulos gelatinizados y deformables, enriquecidos en amilopectina, están inmersos en una matriz continua de amilosa, y son forzados a recristalizar (Biliaderis 1990).

Envejecimiento de pan

El envejecimiento de los productos de panificación está definido como la disminución de la aceptación por parte del consumidor causada por cambios que no resultan de la acción de microorganismos dañinos

(Betchel 1955). Entre las alteraciones que se producen se destacan el endurecimiento de la miga, los cambios en el sabor y el aroma y la pérdida de crujibilidad de la corteza (Cauvian 1998).

El desarrollo de la dureza de la miga con el tiempo es un fenómeno en el que influyen diversos factores. La pérdida de humedad de la miga junto con la recristalización del almidón son los dos mecanismos admitidos como básicos. El mecanismo más ampliamente aceptado fue propuesto por Schoch y French en 1947, según estos autores el almidón es el principal responsable del endurecimiento. Las moléculas de amilosa difundidas al exterior de los gránulos durante la cocción interaccionan durante el enfriamiento, de forma que en el pan fresco se forma un gel firme de amilosa en el que se sitúan los gránulos en cuyo interior se encuentran las cadenas ramificadas de la amilopectina. Durante el almacenamiento, el endurecimiento se debe a la formación de asociaciones entre cadenas de amilopectina. La recristalización de la amilopectina es el fenómeno molecular que produce el endurecimiento del pan.

Se han propuesto otros esquemas para explicar lo que sucede en el pan durante su almacenamiento debido a que existen algunos resultados contradictorios entre la recristalización del almidón y el endurecimiento de la miga del pan (Dragsdorf y Varriano-Marston 1980). Martin et al (1991) postularon a la formación de puentes de hidrógeno entre el gluten y los gránulos de almidón como la principal causa del endurecimiento de pan. Usando un horno de resistencia eléctrica para hornear masa a varias temperaturas menores a 100°C, con una mínima evaporación de agua; encontraron que la miga horneada a mayor temperatura presentaba una mayor ruptura de los gránulos y una mayor solubilización del almidón. A su vez los panes horneados a temperatura más elevadas presentaban mayor firmeza. En base a estos hechos estos autores concluyeron que una temperatura de horneado más alta provoca un mayor hinchamiento y ruptura de los gránulos de almidón, una mayor solubilización del almidón

y un aumento de la pérdida de humedad, por lo que es posible que se establecieran más interacciones con la red de proteínas.

Congelación de la masa

La calidad de las masas congeladas se deteriora gradualmente durante el almacenamiento en estado congelado hecho que se atribuye a la pérdida en la capacidad de retener gases de la masa. Este cambio se debe principalmente a una disminución de la fuerza de la masa, y a la pérdida gradual de la actividad y la viabilidad de las levaduras (Inoue y Bushuk 1992, Stauffer 1993, Casey y Foy 1995). Las principales consecuencias de estos fenómenos son: producción de panes con menor volumen, mayores tiempos de fermentación, y mayor deterioro de la textura final (Dubois y Blockcolsky 1986).

El debilitamiento de la masa de pan durante el almacenamiento en estado congelado y sucesivos ciclos de congelación y descongelación, puede deberse a una pérdida del grado de entrecruzamiento de la red de gluten causada por las sustancias reductoras liberadas por las levaduras durante la congelación (Kline y Sigihara 1968, Hsu et al 1979a) o por una redistribución del agua, causada por un cambio en la capacidad de ligar agua de los constituyentes de la masa; o quizás ambos factores actuando en forma conjunta (Inoue y Bushuk 1991). Una hipótesis alternativa (Varriano-Marston et al 1980, Wolt y D'Appolonia 1984a, Autio y Sinda 1992) sugiere que los cambios estructurales en masas congeladas y descongeladas no están asociados con la liberación de sustancias reductoras de las células muertas de levaduras, sino con una pérdida del grado de entrecruzamiento de la red de gluten por la acción mecánica de los cristales de hielo (formación y recristalización) durante el proceso de congelación. Berglund et al (1991) mostraron que masas almacenadas por 24 semanas en estado congelado y masas sujetas a ciclos de congelación - descongelación presentaron cambios en la distribución de agua y una matriz de gluten menos continua, más cortada y más separada de los

gránulos de almidón. Estos autores sugirieron que los cambios pueden ser causados por la formación de hielo.

El debilitamiento de la masa también puede ser causado por la acción de proteasas que rompen los enlaces peptídicos y debilitan la red de gluten. En harinas obtenidas de trigos sanos y no germinados el nivel de estas enzimas es, probablemente, insuficiente para ser una causa que afecte la calidad de las masas congeladas. Sólo en trigos germinados, con altos niveles de enzimas, pueden afectar la estabilidad de la masa en el almacenamiento (Kulp 1995). Por ello no es aconsejable el uso de suplementos enzimáticos (enzimas fungales, bacterianas o de cereales) en la elaboración de panes congelados.

La estabilidad de los productos congelados también puede ser afectada por los metabolitos de la fermentación de las levaduras. Hsu et al (1979a), mostraron que las levaduras en masas congeladas pueden sufrir pérdida parcial en su capacidad de fermentación por i) los efectos fisiológicos sobre las células, que son mejorados por la fermentación previa a la congelación; y ii) los efectos de ciertos metabolitos de la fermentación. Aunque no identificaron estos metabolitos, el agregado de 2,5 % de etanol causó pérdidas significativas en la capacidad de producción de gas de las levaduras. Además, es posible que estos metabolitos sean un importante factor en la estabilidad de las levaduras congeladas y produzcan efectos concomitantes en las propiedades de la masa (Kulp 1995).

Las alteraciones producidas por el proceso de congelación de la masa sobre el almidón también han recibido cierta atención. Wolt y D'Appolonia (1984b) aislaron almidón soluble de miga de pan elaborado con masa congelada y no congelada. El contenido de amilosa y amilopectina y la proporción amilosa/amilopectina disminuyeron con el incremento del tiempo en estado congelado. Estos investigadores sugirieron que los cambios registrados se debieron probablemente al aumento del tiempo de fermentación y no estuvieron directamente relacionados con la congelación de la masa, dado que los cambios

descritos fueron similares a los que acompañan al envejecimiento de pan convencional. Autio y Sinda (1992) encontraron que la congelación y la descongelación aumentaron la temperatura de inicio de la gelatinización del almidón medida por calorimetría diferencial de barrido. Este cambio pudo deberse a una demora en la velocidad de difusión del agua o a un aumento de la cristalinidad en los gránulos de almidón. Lu y Grant (1999), por su parte, encontraron que la temperatura de inicio y de pico, y la entalpía del proceso de gelatinización del almidón aislado de masa congelada y no congelada aumentaron con el tiempo de almacenamiento en estado congelado. Estos resultados podrían indicar la posibilidad de que se produzca algo de retrogradación dentro de los gránulos durante el almacenamiento o la descongelación de la masa antes de aislar el almidón. Estos autores también mostraron que la cantidad de agua congelable aumentó durante los almacenamientos prolongados en estado congelado, indicando que en esta situación se produjo una redistribución del agua del sistema.

Existen distintos tipos de aditivos que se incorporan a las masas congeladas con el objetivo de contrarrestar los inconvenientes relacionados con la congelación de la masa. Cada uno de estos aditivos posee mecanismos de acción diferentes sobre la masa. La adición de gluten vital a masas relativamente débiles mejora el volumen y el grano de la miga de pan, y disminuye el tiempo de fermentación de masas congeladas (Wang y Ponte 1994). El emulsionante formado por ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetil tartárico (DATEM) es un reforzador de masas que mostró ser efectivo para disminuir la velocidad de endurecimiento y mejorar el volumen de panes obtenidos a partir de masas frescas y congeladas (Wolt y D'appolonia 1984b, Xu et al 1992, Nemeth et al 1996, Kenny et al 1999). La goma guar es un polisacárido derivado del endospermo molido de la *Cyamopsis tetragonolobus*, se usa frecuentemente en combinación con otros hidrocoloides (goma garrofin o carrageninas) como estabilizante en helados, rellenos de pasteles y otros productos congelados (Alexander 1999). La harina de soja incrementa el

contenido proteico y mejora la estabilidad y la capacidad de retención de gas de las masas, produciendo mayor volumen de pan y mejor textura y color de la miga (Brown 1993).

Las posibilidades de difusión del método de producción de pan por la congelación de la masa dependen totalmente de la solución de los problemas que trae aparejado el proceso de congelación y almacenamiento en estado congelado de las masas, para lo que es imprescindible el estudio de las transformaciones físico - químicas que se producen. Estos conocimientos además contribuirán a entender mejor los procesos básicos que sufren los biopolímeros presentes en las harinas durante la elaboración del producto, su congelación y posterior almacenamiento en estado congelado.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar las transformaciones fisicoquímicas que se producen durante la congelación y el almacenamiento en estado congelado de las masas para elaborar pan.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el efecto del proceso de congelación y almacenamiento en estado congelado sobre la calidad del pan.
- Determinar los cambios fisicoquímicos y funcionales sufridos por las proteínas durante la congelación y el almacenamiento de la masa de pan.
- Determinar los cambios fisicoquímicos y funcionales sufridos por el almidón durante la congelación y el almacenamiento de la masa de pan y el envejecimiento del pan.

- Estudiar el efecto del proceso de congelación de las levaduras sobre su viabilidad, capacidad de producción de gas y las sustancias liberadas por las células.
- Analizar la influencia del proceso de congelación y el almacenamiento a -18°C sobre el comportamiento reológico de las masas.
- Estudiar el efecto del proceso de congelación y almacenamiento sobre la microestructura de la masa.
- Estudiar el efecto del agregado de aditivos a las masas sobre el proceso de congelación y almacenamiento a -18°C .
- Estudiar el efecto de la precocción de la masa y su almacenamiento sobre la calidad del pan.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración del pan

Harina

Se utilizó harina de trigo 000 sin aditivos, provista por el molino Carlos Boero Romano SAIC. Para su caracterización se realizaron las siguientes determinaciones:

- **Proteínas.** El contenido de nitrógeno en las harinas se determinó por medio del micro método de Kjeldahl modificado para ácido bórico. Se realizó una mineralización de 50 mg de harina con H_2SO_4 a $400^{\circ}C$ en un bloque de digestión Technicon BD-40 (Technicon, Estados Unidos de América); el amonio resultante se destiló sobre ácido bórico y se tituló con HCl. El porcentaje de proteína total se calculó como $N \times 5,7$ (Método 46-12, AACC 1995).
- **Humedad.** El contenido de humedad se determinó por diferencia de pesada antes y después de calentar en estufa a $130^{\circ}C$ a presión atmosférica normal, durante 2 horas, aproximadamente 2 g de harina exactamente medidos. Los resultados se expresaron como porcentaje de agua perdida (Método 44-19, AACC 1995).
- **Cenizas.** El contenido de cenizas se determinó por diferencia de pesada antes y después de calentar en mufla a $600^{\circ}C$ hasta masa constante 2 g de harina exactamente medidos (Método 08-03, AACC 1995).
- **Gluten.** Se utilizó un equipo Glutomatic (Perten Instruments AB, Suecia). Para el análisis se preparó en el equipo una masa de harina y agua, se lavó esta masa con agua, se separó el agua adherida y se pesó el gluten húmedo. (Método 38-12, AACC 1995).
- **Características reológicas.** Se utilizó un Alveógrafo (Chopin, Francia). Se preparó una masa de harina, agua y cloruro de sodio, con la que se obtuvieron cinco piezas en forma de disco. Después de un período de tiempo especificado se formó una burbuja con cada una de las piezas y se trazaron curvas registrando la presión dentro de la burbuja, la que está

relacionada con la resistencia de la masa a la deformación (Método 54-30A, AACC 1995).

- **Falling Number.** Se determinó por el test de Hagberg con un equipo de Falling Number (Pert en Instruments AB, Suecia), usando 7 g de harina y 25 mL de agua destilada. En el análisis se produjo la gelatinización rápida de una suspensión acuosa de harina en un baño de agua mantenido a 100°C. La acción de la α -amilasa sobre el almidón de la muestra produjo la licuefacción del gel, midiéndose el tiempo de caída del émbolo agitador (Método 56-81B, AACC 1995).

- **Absorción de agua, tiempo de desarrollo de la masa, estabilidad, aflojamiento de la masa.** Se empleó un Farinógrafo Brabender (C.W. Brabender Instruments, Inc., Alemania). Se obtuvo un diagrama de la resistencia que opone la masa al trabajo mecánico continuo en función del tiempo, en condiciones constantes de ensayo. Dicho diagrama permitió extraer diversas conclusiones acerca de la aptitud industrial de la harina. (Método 54-21, AACC 1995).

Levadura

Se utilizó levadura fresca prensada comercial (CALSA, Argentina).

Formulación de la masa

Los ingredientes utilizados para la elaboración de la masa control fueron: harina 100 %, levadura prensada 3 %, cloruro de sodio 1,8 %, propionato sódico 0,2 %, ácido ascórbico 0,015 % y agua en cantidad óptima (\approx 63 %). Los aditivos agregados fueron: gluten 1,5 %, goma guar 0,5 %, harina de soja 10,0 %, ésteres de monoglicéridos y del ácido diacetil tartárico (DATEM) 0,5 %. También se trabajó con un porcentaje mayor de levadura que el control (5,0 %).

Método de elaboración de pan

Para cantidades de harina mayores a 500 g se utilizó una amasadora Argental L-20 (Argental, Argentina) y un tiempo de amasado de 5 min, y para pequeñas cantidades de harina una amasadora Philips HR 1495 (Philips, Argentina), y un tiempo de amasado de 2 min. La levadura y la sal se disolvieron previamente en agua, en forma separada, y los demás ingredientes se agregaron sólidos. La temperatura del agua se calculó para obtener una masa final a 23-24°C. La masa obtenida se sometió a un período de descanso de 15 min en una cámara de fermentación a 30°C y con 70 % HR. Inmediatamente se desgasificó y laminó en una sobadora (Mi-Pan vf roller, Argentina), con dos rodillos de 50,0 x 12,7 cm. Seguidamente se dividió en piezas iguales de 80 g que se bolearon a mano. Estas piezas se colocaron en bandejas y se fermentaron hasta volumen óptimo en una cámara de fermentación a 30°C y 96 % HR (se obtuvo el tiempo total de fermentación).

El volumen óptimo de las piezas se determinó por el tiempo a partir del cual disminuyó la velocidad de incremento del volumen. Para el registro de la fermentación se colocaron piezas de masa (50 g) en vasos de fermentación graduados y se midió el aumento de volumen de la masa cada 15 min. Por último las piezas se hornearon a 200°C por 18 min en un horno rotativo a gas Cyclo (Ciclo Ingeniería, Argentina) previa vaporización de agua en su superficie.

Masas congeladas

Inmediatamente después de boleadas, las piezas de masa se colocaron en bolsas de polietileno de 20 x 30 cm con un espesor de 50 µm selladas térmicamente y se almacenaron en un congelador (Frare, Argentina) a -18°C. En el momento de obtener pan, las piezas se sacaron del envoltorio y se mantuvieron por una hora en cámara de fermentación a 30°C con baja humedad relativa para evitar la condensación del agua sobre la superficie de la masa fría. Seguidamente, las masas se

fermentaron en cámara a 30°C con un 96 % de HR, hasta volumen óptimo. Las piezas fermentadas se hornearon a 200°C por 18 min.

Pan precocido

Las piezas fermentadas se precocieron en el horno a 200°C por 4,5; 9,0 y 13,5 min. Los panes cocidos parcialmente se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 1 h. Seguidamente, se envasaron en bolsas de polietileno selladas térmicamente y se almacenaron en un refrigerador a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ (General Electric, Estados Unidos de América) y en un congelador a -18°C (Frare, Argentina). A los 3 y 8 días de almacenamiento los panes precocidos se retiraron del congelador y del refrigerador y se dejaron estabilizar embolsados por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se hornearon a 200°C hasta completar un tiempo total (precocción + horneado) de 20,0 min.

Para minimizar las diferencias que puedan provenir del amasado y la fermentación, la misma masa fue usada para obtener pan fresco (usado como control) y pan a partir de masas congeladas o precocidas.

Caracterización del pan

Volumen y densidad de pan

El volumen de la hogaza de pan se determinó por desplazamiento de semillas de colza, después de 24 h de horneado. El volumen específico se obtuvo dividiendo el volumen de la muestra por su peso. Se realizaron 5 determinaciones de cada lote, que se informaron como valor promedio \pm desviación estándar.

También se determinó la relación de forma (A/D) de la hogaza de pan. Este parámetro se calculó como el cociente entre el alto y el ancho de la hogaza de pan. Se realizaron 3 mediciones por cada lote de muestra y se informaron como valor promedio \pm desviación estándar.

Estructura de la miga

En el tratamiento de imágenes existe una importante herramienta que reduce la complejidad de los datos de imágenes digitales disminuyendo el número de niveles de gris de una imagen (inicialmente 255 niveles). La imagen entera es fragmentada por un simple valor de gris para crear una imagen binaria, todos los píxeles con nivel de gris por encima del umbral se muestran en blanco y por debajo en negro (Figura 1). Se puede generar una imagen binaria óptima por la selección de un simple umbral de gris, los píxeles (puntos de la pantalla del monitor de un sistema PC que se combinan para formar una imagen) con valores de gris más bajos que el valor umbral, podrían ser considerados parte del objeto. Se puede encontrar interactivamente un nivel apropiado de umbral de gris, variando el nivel de gris hasta que la imagen conserve los rasgos fundamentales de la contraparte monocromática (Sapirstein et al 1994, Tan et al 1997)

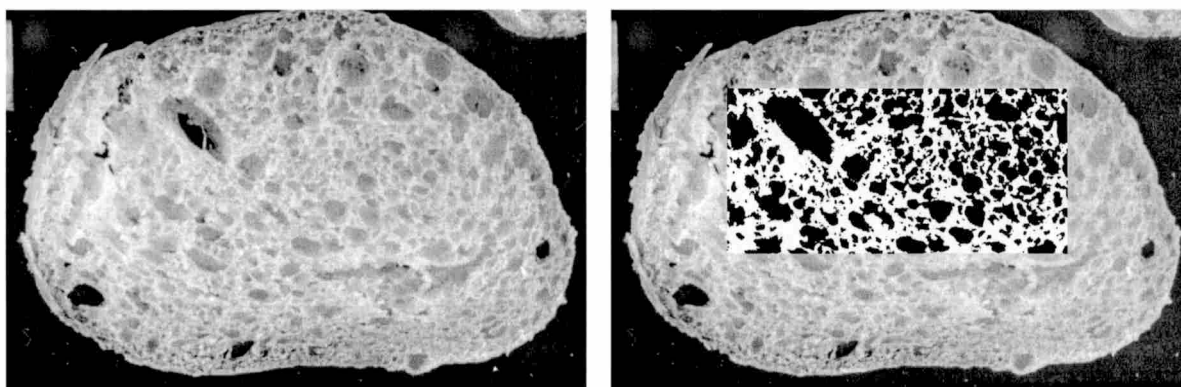


Figura 1. Fotografías de una rodaja de pan mostrando la imagen en escala de grises (0-255 niveles) y a su lado la misma imagen con una zona transformada en imagen binaria con un umbral de 180. Todos los píxeles con nivel de gris por encima de este valor umbral se convierten en blanco y por debajo del umbral, en negro.

Para analizar la estructura de la miga de los panes, se tomaron fotografías de rodajas obtenidas de la parte central de cada pan, dos por lote, con una cámara Nikon-90 con lente macro de 50 mm, filtro azul con 80 B, velocidad 1/8 s y abertura de diafragma 11 (Nikon, Japón). La iluminación se realizó con cuatro lámparas foto - flood de 500 W a una distancia de 70 cm del objetivo. Las fotos se digitalizaron y se analizaron con el programa de análisis de imágenes Image-pro 3.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos de América).

Las imágenes se analizaron en escala de grises (0 negro, 255 blanco) y el programa seleccionó automáticamente un nivel de gris que se utilizó para transformar cada una de las imágenes en binarias. Este método de selección del valor umbral representó mejor los rasgos fundamentales de las imágenes que la selección de un valor de umbral único e igual para todas las imágenes, debido a que existen pequeñas diferencias en los fondos de cada imagen. La imagen binaria tuvo sólo dos niveles de grises: 0 para los alvéolos de gas, negro, y 255 para las paredes de los alvéolos, blanco. Se seleccionó manualmente un área representativa de la parte central de cada rodaja de pan (Figura 1). Se asignó la categoría de objeto a aquellas zonas de la imagen que tenían una intensidad de gris entre 0 y el valor umbral. El programa seleccionó automáticamente las partes que se tomaron como objetos (celdas de gas), según la intensidad de gris que tenían y midió automáticamente la proporción de celdas por unidad de área (área porcentual de celdas). El análisis de una fotografía conteniendo un objeto de medidas estándares sirvió para la calibración del programa.

Textura de la miga

Para el análisis de la firmeza de la miga, los panes frescos, 1 h después de horneados, se envasaron en bolsas de polietileno selladas térmicamente y se almacenaron a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. A distintos tiempos de almacenamiento, se tomaron 3 panes y se obtuvieron dos rodajas con un espesor de 25 mm, descartándose los extremos de cada pan. Los cortes se realizaron con un cuchillo especial para pan y utilizando un dispositivo

que aprisiona la hogaza y permite obtener rodajas de tamaño similar. El centro de cada rodaja de pan se sometió a un análisis de compresión usando un texturómetro TX-TA2 (Stable Micro Systems, Inglaterra), bajo las siguientes condiciones: celda de compresión de 5 Kg, velocidad del cabezal: 100 mm/min, deformación máxima: 40 %, diámetro del émbolo de penetración: 36 mm. La firmeza de la miga se definió como la fuerza, en g, necesaria para comprimir una rodaja hasta un 25 % del espesor original (Método 74-09, AACC 1995). Se realizaron 6 determinaciones por lote, informándose el valor promedio \pm la desviación estándar.

Caracterización estructural de la masa

Viscoelasticidad de la masa

En los ensayos reométricos se aplica una deformación oscilatoria de amplitud constante y se mide la tensión generada dentro de la muestra, como el esfuerzo de corte de respuesta. Los materiales responden a la deformación aplicada disipando energía en forma de calor, disipación viscosa; almacenando energía elástica; o a través de la combinación de estos dos mecanismos. El análisis dinámico mecánico permite medir ambos tipos de propiedades.

El comportamiento elástico está representado por un resorte que sigue la ley de Hooke (Ecuación 1), mientras que el viscoso está representado por un amortiguador que sigue la ley de Newton (Ecuación 2). Las leyes mencionadas describen dos extremos.

$$\tau_E = G \gamma_E \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\tau_V = \eta \dot{\gamma}_V \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde τ es el esfuerzo de corte, G es el módulo constante del resorte, γ_E es la deformación, η es la viscosidad y $\dot{\gamma}_V$ es la velocidad de corte.

La mayoría de los materiales muestran los dos tipos de comportamiento, y en consecuencia son llamados viscoelásticos. Para

caracterizar tales materiales deben considerarse los dos tipos de respuesta.

La ecuación para una deformación oscilatoria sobre una muestra puede escribirse como:

$$\gamma = \gamma_0 \sin \omega t \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde γ_0 es la deformación máxima o amplitud y ω la velocidad angular.

Si se reemplaza la Ecuación 3 en la Ecuación 1, se obtiene una función seno (Ecuación 4) para el esfuerzo de corte resultante que actúa sobre el resorte, indicando que la deformación aplicada y el esfuerzo de corte elástico se encuentran en fase. Derivando la Ecuación 3 respecto del tiempo y reemplazando en la Ecuación 2 se obtiene una función coseno para el esfuerzo de corte viscoso (Ecuación 5) que se encuentra 90° fuera de fase con respecto a la deformación aplicada.

$$\tau_E = G \gamma_0 \sin \omega t \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$\tau_V = \eta \omega \gamma_0 \cos \omega t \quad (\text{Ecuación 5})$$

La medida de la diferencia de fase entre la deformación aplicada y el esfuerzo de corte de la respuesta indica la viscoelasticidad de la muestra. Si la diferencia de la fase es 0° la sustancia es puramente elástica, por el contrario, si es 90° la muestra es puramente viscosa. Si la diferencia se encuentra entre estos dos valores es viscoelástica.

La relación entre la amplitud del esfuerzo de corte y la deformación máxima se denomina módulo complejo, G^* . Este es una medida de la resistencia total del material a la deformación aplicada.

$$G^* = \tau_0 / \gamma_0 \quad (\text{Ecuación 6})$$

La energía almacenada durante la deformación está representada por el módulo elástico o de almacenamiento, G' , y la energía disipada en el elemento viscoso por el módulo viscoso o de pérdida, G'' .

$$G' = G^* \cos \phi \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$G'' = G^* \sin \phi \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde ϕ es el ángulo de desfase entre el esfuerzo de corte y la deformación. Si la muestra es puramente elástica, $\phi = 0^\circ$, $G^* = G'$ y $G'' = 0$. Por el contrario, si es puramente viscosa, $\phi = 90^\circ$, $G^* = G''$ y $G' = 0$.

El módulo complejo se relaciona con G' y G'' a través de la siguiente ecuación:

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (\text{Ecuación 9})$$

La viscosidad compleja (η^*) es una función alternativa al G^* , es una medida de la magnitud de la resistencia total de la muestra al corte dinámico, y se define como:

$$\eta^* = G^* / \omega = \tau_0 / \gamma_0 \omega \quad (\text{Ecuación 10})$$

Otra función que se utiliza habitualmente para describir el comportamiento viscoelástico de un material es la tangente del ángulo de desfase. Esta se define como:

$$\tan \phi = G'' / G' \quad (\text{Ecuación 11})$$

Los reómetros poseen tres parámetros a controlar, frecuencia de oscilación, amplitud de la deformación y temperatura. Un análisis típico mantiene dos de estos parámetros constantes mientras varía el tercero.

Las medidas oscilatorias dinámicas se realizaron en un reómetro Haake CV20 (Haake, Alemania) usando un sensor de platos paralelos con una separación de 1 mm. Para el cálculo del módulo complejo (G^*), módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G''), viscosidad dinámica (η^*), y la $\tan \phi$ (G'' / G') se utilizó un software Haake osc 2.0.

Se elaboró masa como se indicó previamente y se separaron porciones de 3 g aproximadamente. La masa no congelada fue medida inmediatamente después de elaborada y luego de 30 min de fermentación. El resto de la masa fue congelada y almacenada a -18°C . Transcurridos 1, 60, 120 y 240 días de almacenamiento, se descongelaron dos porciones de masa durante 60 min a 30°C . La masa descongelada fue analizada

inmediatamente y luego de 30 min de fermentación. Para esto se colocó la porción de masa sobre el plato inferior mantenido a 30°C. Se bajó el cabezal y se eliminaron los bordes sobrantes de masa con una hoja de bisturí, se adicionó silicona de baja viscosidad alrededor de los bordes de los platos para evitar la deshidratación de la masa. La muestra se dejó descansar durante 2 min para relajar las tensiones producidas en la compresión antes de iniciar el ciclo de deformación.

Para determinar el rango de viscoelasticidad lineal de las masas se realizaron barridos de deformación (0,4 - 100 %) a frecuencia constante (1 Hz). Determinado el rango lineal, se hicieron barridos de frecuencia a temperatura (30°C) y deformación constante para analizar el comportamiento viscoelástico de las masas.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido provee un medio apropiado para caracterizar las propiedades físicas y los atributos de textura de la masa y los panes (Berglund et al 1991, Rojas et al 2000). Las ventajas que hacen extremadamente útiles a la SEM como herramienta en la observación de la estructura de los alimentos es su gran profundidad de foco y la posibilidad de obtener imágenes tridimensionales de la superficie de las muestras.

En este ensayo las masas fueron preparadas sin incluir levadura en su formulación, para prevenir cualquier cambio en la disposición estructural producida por la fermentación. Se cortó una porción de masa con una hoja de bisturí. Las piezas de masa se fijaron en glutaraldehído (1:30) por 2 h, seguidamente, fueron sumergidas en una serie de disoluciones de acetona (25, 50, 75 y 80 %) por 20 min en cada graduación, y en acetona al 100 % por tres intervalos consecutivos de 20 min para asegurar una deshidratación completa. Luego, las muestras fueron desecadas por punto crítico. El secado por punto crítico (temperatura y presión en la que el líquido y el vapor tienen la misma

densidad) con CO₂ remueve la acetona sin provocar tensiones superficiales, ya que estas fuerzas pueden deformar la ultra estructura de la muestra. Las masas desecadas fueron cubiertas con partículas de oro formando una película de 300 Å con un metalizador Sputter Coater (Energy Beam Sciences, Estados Unidos de América). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de barrido electrónico Jeol 35 CF (Jeol, Japón) a 6 kV, con diferentes aumentos (600x, 1500x, 3600x y 10000x).

Caracterización de las proteínas

Preparación de los extractos de proteínas

Los extractos se prepararon a partir de masa liofilizada o harina (30 mg/mL). Se elaboró masa según el método descrito y se congeló por distintos tiempos a -18°C. Las masas congeladas y no congeladas se liofilizaron y se molieron en mortero.

Los extractos de proteínas no reducidas fueron preparados por suspensión de masa liofilizada en solución buffer (pH 6,8), conteniendo 0,063 M de Tris/HCl, 2 % (p/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS), 10 % (v/v) de glicerol, y 0,01 % (p/v) de azul de bromofenol (Ng y Bushuk 1987).

Los extractos de proteínas reducidas fueron preparados por suspensión de masa liofilizada o harina en solución buffer (pH 6,8) conteniendo 0,063 M de Tris/HCl, 1,5 % (p/v) de SDS, 3 % (v/v) de 2-mercaptoetanol, 10 % (v/v) de glicerol, y 0,01 % (p/v) de azul de bromofenol.

Las mezclas de muestra-buffer se dejaron 2,5 h a temperatura ambiente, agitándose cada 15 min en vortex. Se calentaron en un baño de agua a 100°C por 3 min, y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Las suspensiones fueron centrifugadas a 1200 x g por 5 min. El sobrenadante se utilizó como el extracto de proteínas.

Electroforesis

Las electroforesis se realizaron en placa (70 x 80 mm) sobre geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), de acuerdo al sistema de buffer discontinuo de Laemmli (1970). Se utilizó un equipo Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad laboratories, Estados Unidos de América). Las corridas se hicieron con voltaje constante (150 V), hasta que el marcador del frente alcanzó el final del gel (aproximadamente 90 min).

Las subunidades proteicas se analizaron mediante un procedimiento de electroforesis en gel con un apilador ("stacking") y un separador, con 4 % y 12 % de acrilamida respectivamente.

Se utilizaron como marcadores de masa molecular una mezcla constituida por miosina (200,0 kDa), β -galactosidasa (116,25 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), albúmina sérica (66,2 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica (31,0 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) y aprotina (6,5 kDa) (Bio-Rad laboratories, Estados Unidos de América).

Con el objetivo de caracterizar las proteínas no reducidas, se separaron los agregados proteicos en fracciones según su tamaño y su movilidad. Se llevó a cabo un procedimiento de electroforesis en gel con varios apiladores (stacking) y un separador. Se hicieron "stackings" con distintas concentraciones de acrilamida y bisacrilamida. Los geles preparados contenían 4, 6, 8 y 10 % de acrilamida y 0,108, 0,162, 0,216 y 0,270 % de bisacrilamida respectivamente. El gel separador contenía 12 % de acrilamida y 0,480 % de bisacrilamida.

Se usaron geles con un espesor de 0,75 mm para SDS-PAGE en multistacking analítico y de 1,5 mm para los análisis preparativos.

Extracción de proteínas de los geles en "multistacking"

Las proteínas de las distintas partes de los geles en multistacking preparativos fueron reducidas y extraídas con solución buffer (pH 6,8)

conteniendo 0,063 M de Tris/HCl, 1,5 % (p/v) de SDS, 3 % (v/v) de 2-mercaptoetanol, 10 % (v/v) de glicerol, y 0,01 % (p/v) de azul de bromofenol.

La extracción se realizó a temperatura ambiente durante 48 h con agitación continua. Finalizado este período, se colocó la mezcla en baño de agua a 100°C por 10 min. Una alícuota de la solución fue utilizada como extracto de proteínas.

Cuantificación de fracciones proteicas en los geles

El análisis de las bandas proteicas en los geles se llevó a cabo por densitometría utilizando un equipo Pharmacia Biotech (Pharmacia Biotech, Estados Unidos de América) provisto con el programa Image Master VDS. Se usaron unas líneas tomadas en el gel a analizar para obtener los valores de “background”. El volumen de las bandas proteicas (IOD: densidad óptica integrada) es representado por el valor de intensidad media de la banda menos el valor obtenido del background multiplicado por el área de la banda.

La proporción de proteínas se informó como IOD relativa a la cantidad total de proteínas en la línea del gel, es decir, como la relación entre el valor de IOD de la banda y el valor de IOD total de la línea.

Se realizaron al menos 3 determinaciones por punto, informándose el valor promedio.

Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Los extractos se prepararon a partir de masa liofilizada (25 mg/mL). Se elaboró masa según el método descrito previamente y se congeló por distintos tiempos a -18°C. Las masas congeladas y no congeladas se liofilizaron y se molieron en mortero.

Los extractos de proteínas no reducidas fueron preparados por suspensión de masa liofilizada en solución buffer fosfato 0,05 M (pH 6,9), con 2 % (p/v) de SDS (Singh et al 1990).

Las mezclas de muestra-buffer se dejaron 2,5 h a temperatura ambiente, agitándose cada 15 min en vortex. Las suspensiones fueron centrifugadas a 12000 x g durante 10 min. El sobrenadante se filtró por filtro de 0,22 µm (Milipore, Alemania) y el filtrado se calentó en un baño de agua a 80°C por 2 min. La solución obtenida se inyectó directamente en la columna.

El volumen inyectado fue de 100 µl y de 1000 µl para ensayos analíticos y preparativos respectivamente. Las muestras fueron inyectadas en forma automática por un cromatógrafo líquido de presión media AKTA explorer 100 (Pharmacia Biotech, Estados Unidos de América) en una columna Superdex 200 HR 10/20 (Pharmacia Biotech, Estados Unidos de América). La solución de elución utilizada fue buffer fosfato 0,05M (pH 6,9) con 0,1 % (p/v) de SDS (sonicada, filtrada por filtro de 0,45 µm y desgaseada bajo vacío). Las velocidades de flujo fueron 0,50 y 0,25 mL/min. La absorbancia fue medida a 210 nm (Singh et al 1990). Los volúmenes de elución y las áreas de los picos fueron cuantificados con el programa Unicorn Version 2.30 software (Pharmacia Biotech, Estados Unidos de América).

Se utilizaron como marcadores de masa molecular: tiroglobulina (669,0 kDa), apoferritina (443,0 kDa), albúmina sérica bovina (66,0 kDa), albúmina sérica (66,2 kDa) y anhidrasa carbónica (29,0 kDa) (Sigma, Estados Unidos de América).

Caracterización del almidón

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los procesos de gelatinización y retrogradación del almidón en masas de pan se examinaron por calorimetría diferencial de barrido utilizando un calorímetro Polymer Laboratories (Rheometric Scientific,

Inglaterra). La calorimetría diferencial de barrido es una técnica en la cual la muestra y el material de referencia se someten a un programa controlado de temperatura y se mide la diferencia en energía suministrada en cada caso, en función de la temperatura alcanzada. El cambio de entalpía (ΔH) y las temperaturas de transición corregidas, se obtuvieron a través del software PL-V5.41 (Rheometric Scientific, Inglaterra). Para cada termograma el programa trazó una línea de base entre el comienzo y la finalización de la transición térmica. El área del termograma representa el cambio de entalpía del proceso. La calibración de equipo se realizó usando indio y la referencia utilizada fue una cápsula vacía con tapa doble de aluminio. Se realizaron un mínimo de 2 determinaciones de cada lote, que se informaron como valor promedio \pm desviación estándar.

Gelatinización del almidón

Para las determinaciones calorimétricas, se elaboró masa según la formulación descrita anteriormente. La masa fue desgasificada, laminada, y boleada a mano. Entre 15-20 mg de masa se pesaron en las cápsulas. Un grupo de estas fue congelado a -18°C por distintos lapsos y otro se fermentó directamente (a 30°C por 45 min). A distintos períodos de tiempo las muestras se descongelaron y se fermentaron (a 30°C por 2 h). Las masas congeladas - descongeladas y las no congeladas se calentaron en el calorímetro a temperaturas similares a las medidas en el centro de la miga durante el proceso de horneado, con el objetivo de “hornear” la masa en el calorímetro. Para simular el perfil de temperatura en el centro de la miga de pan durante el horneado, los experimentos se llevaron a cabo mediante el siguiente programa de temperatura: estabilización por 2 min a 30°C , calentamiento desde 30°C hasta 110°C a una velocidad de $11,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y por último estabilización por 5 min a 110°C (León et al 1997a).

En forma paralela, se realizaron ensayos donde las masas se envasaron en bolsas de polietileno, se almacenaron a -18°C y a distintos períodos de tiempo, se descongelaron y fermentaron (a 30°C por 2 h).

Posteriormente se armaron las cápsulas y se calentaron en el calorímetro desde 30 a 130°C a una velocidad de 10°C/min.

Retrogradación de la amilopectina

Para analizar la retrogradación de la amilopectina las muestras gelatinizadas (“horneadas”) en las cápsulas de DSC se dejaron enfriar, y se almacenaron por diferentes períodos de tiempo a dos temperaturas: $3\pm 1^\circ\text{C}$ y $20\pm 2^\circ\text{C}$. Las muestras fueron calentadas nuevamente en el calorímetro desde 30°C a 130°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

Difracción de rayos-X

La difracción de rayos-X es una de las herramientas más importantes para la caracterización de sólidos. Los rayos-X son radiaciones electromagnéticas de una longitud de onda (λ) cercana a 0,1 nm, longitud comparable a los espaciamentos moleculares en un cristal y cercana a la longitud de un átomo. Estas radiaciones se encuentran en la zona del espectro electromagnético entre los rayos gama y los ultravioleta. Los sólidos cristalinos presentan patrones únicos de difracción de rayos-X que pueden ser utilizados para su identificación. Esta técnica sirve también para determinar la estructura cristalina de los materiales, es decir para establecer como están empaquetados los átomos y las distancias interatómicas que los separan.

Los diagramas fueron interpretados mediante la ecuación de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (\text{Ecuación 12})$$

Donde n es un número natural; d la distancia interplanar y θ el ángulo de incidencia. En los espectros se registraron la intensidad en ordenadas y los ángulos de 2θ en abscisas. Para obtener el valor de d se midieron los grados recorridos a partir de 5° y se dividieron por dos. Para este sistema $n\lambda$ resultó 1,54 Å. A partir de este valor y conociendo el

ángulo θ se calcularon las distancias interplanares que definen el tipo de estructura cristalina presente.

Para esta experiencia se elaboró pan a partir de masa congelada y no congelada según el método descrito. Se dejaron enfriar los panes horneados por 2 h y se les quitó la corteza. La miga se sumergió en nitrógeno líquido por 2 min y luego se la molió en forma de polvo fino con un molino eléctrico Janke & Kunkel A10 (GmbH & Co, Alemania). La muestra molida se colocó en tubos herméticos con tapa y se los almacenó a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y $3 \pm 1^\circ\text{C}$. A diferentes periodos de almacenamiento (0, 1, 2, 5 y 7 días), se colocó miga molida formando una delgada capa en un portamuestra de vidrio, empacada tan densamente como fue posible, con su superficie alisada y paralela a la cara del portamuestra, y se obtuvo el patrón de difracción de rayos-X. Se utilizó un difractómetro de polvo Philips PW 1710 equipado con un programa de análisis de datos PC-APD (Philips, Estados Unidos de América) con monocromador de grafito cristalino. Las condiciones de operación fueron las siguientes: radiación $K\alpha$ de Cu, voltaje: 50 kV, corriente: 30 mA y velocidad de corrida: $1,2^\circ/\text{min}$. Se barrieron ángulos de 5° a 35° .

Las áreas cristalinas y la fracción amorfa se cuantificaron por ajuste de los patrones de difracción con el programa PeakFit v4 for win32 (Jandel Scientific, Estados Unidos de América). Los picos de difracción correspondientes a las estructuras cristalinas se tomaron como curvas de forma Lorentziana, mientras que el pico representativo de la estructura amorfa como curvas Gaussianas. La Figura 2 muestra el patrón ajustado para el diagrama de difracción de harina de trigo.

El grado de cristalinidad total se determinó mediante la relación entre el área total de la fracción cristalina (picos) y el área total de la fracción cristalina más el área de la fracción amorfa. Además se determinó el grado de cristalinidad tipo B como la relación entre el área de la fracción cristalina correspondiente a la estructura B (picos representativos de B) y el área total de la fracción cristalina más el área de la fracción amorfa.

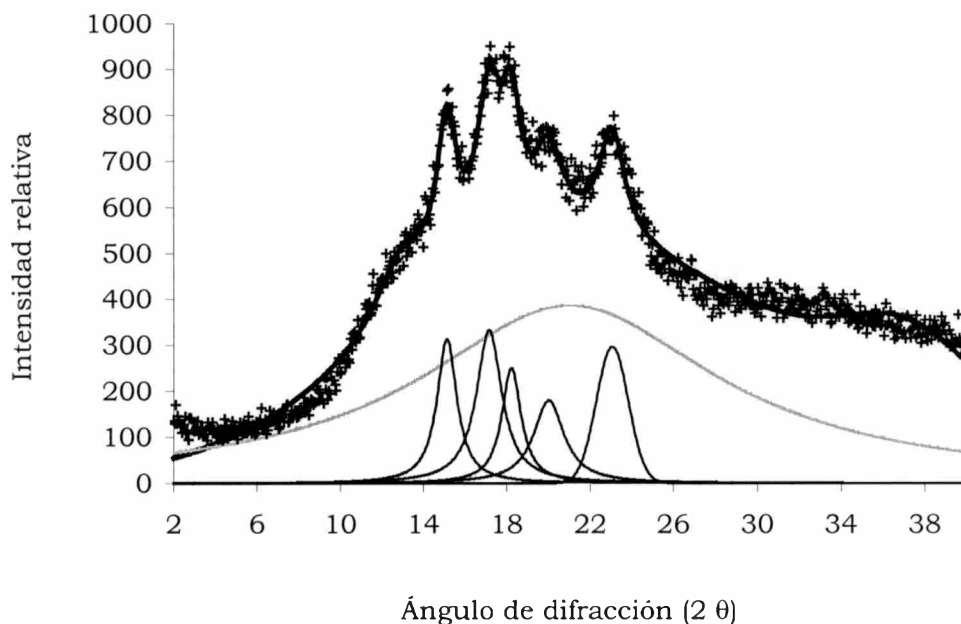


Figura 2. Difractograma de harina de trigo (+), picos cristalinos (líneas continuas), halo amorfo (línea punteada gris), y curva ajustada por el programa (línea continua gruesa).

Análisis de levaduras

Capacidad de producción de CO₂

Para este ensayo la levadura prensada se colocó en frascos de polipropileno con tapa hermética y se congeló por 1, 40, 60 y 90 días. Pasado el período correspondiente se descongeló por 45 min a 30°C. Se determinó la capacidad de producción de CO₂ mediante una unidad de fermentación formada por un erlenmeyer (donde se produjeron las fermentaciones en atmósfera de N₂, con agitación continua y termostatización a 30°C) y dos kitasatos conectados con tubos de goma (donde se hizo burbujear el gas producido por la fermentación). Los ensayos se realizaron con 2 g de levadura en 100 mL de medio de cultivo líquido, formado por lixiviado de papa y 2 g de glucosa (Dhingra y Sinclair 1985). El tiempo de fermentación fue de 90 min.

El CO_2 producido en este recipiente fue arrastrado por el flujo de N_2 a dos kitsatos consecutivos en los que se colocó una solución NaOH 2 N. Una vez terminada la fermentación, se tomó una alícuota de solución (10 mL) de cada recipiente y se cuantificó el contenido de CO_2 por titulación con HCl 1 N (las titulaciones se realizaron por duplicado). Se utilizó fenolftaleína como indicador del punto final en la neutralización del NaOH y en la acidificación de carbonato a bicarbonato y anaranjado de metilo en la neutralización del bicarbonato.

En una primera etapa se determinaron las condiciones óptimas de cantidad de levadura y tiempo de fermentación para producir un ensayo repetitivo. En las Figuras 3 y 4 se muestra como varió el volumen de CO_2 producido por las células cuando se modificó la cantidad de levadura agregada y el tiempo de fermentación. Considerando el punto en que se alcanza la meseta en el desarrollo de la fermentación se concluyó que los valores óptimos para estos ensayos eran 2 g de levadura por batch y 90 min de tiempo de fermentación.

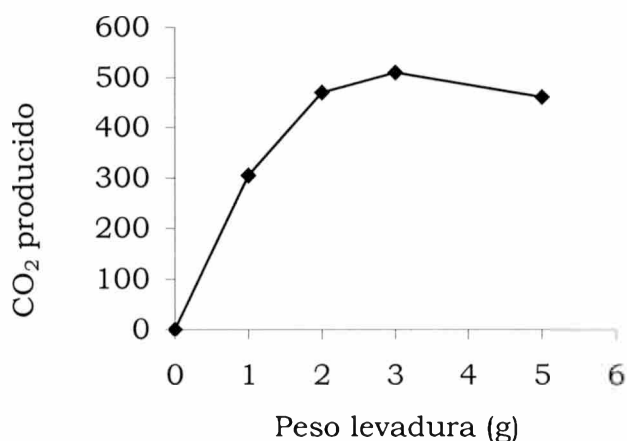


Figura 3. Efecto de la cantidad de levadura prensada agregada al fermentador sobre la cantidad de gas producida por las células.

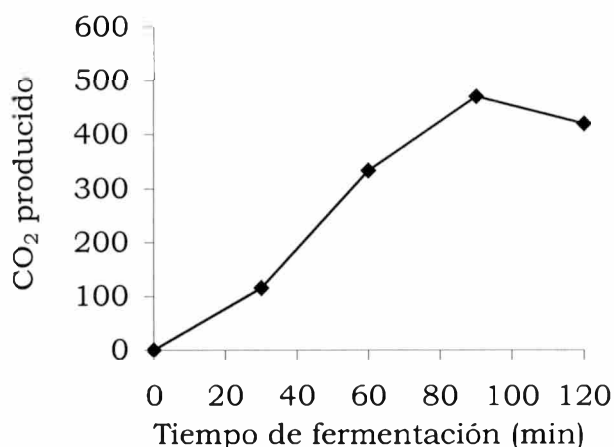


Figura 4. Efecto del tiempo de fermentación sobre la cantidad de gas producida por las células.

Viabilidad de levaduras en masa

La masa de pan, elaborada según el procedimiento mencionado anteriormente, se analizó fresca y congelada por 1, 40, 60 y 90 días. Las muestras congeladas se descongelaron por 45 min a 30°C. Para determinar la influencia de un ciclo de congelación - descongelación parcial sobre la masa almacenada a -18°C, 24 h antes de la descongelación, la masa se sometió a un ciclo de descongelación parcial por 45 min a 4°C. Pasado este tiempo, la masa se congeló nuevamente hasta el momento de su descongelación total.

Para establecer el número de células de levadura en la masa se preparó una placa para contar unidades formadoras de colonias (Método 42-50, AACC 1995). Como medio de cultivo se utilizó agar papa - dextrosa deshidratado (Difco Laboratories, Estados Unidos de América).

Preparación del medio: se disolvieron 39 g de medio deshidratado en 1 L de agua destilada con calentamiento. Las placas, el medio de cultivo y todos los accesorios usados para el análisis de la muestra, salvo que se aclare otro medio, se esterilizaron en autoclave 121-124°C por 15 min. A 100 mL de medio estéril previamente fundido se le agregaron 1,9 mL de ácido tartárico estéril (10 %) para alcanzar un pH de 3,5.

Preparación de la muestra: la masa trozada se licuó con una solución de peptona 0,1 % (p/v) durante 5 min, en una licuadora esterilizada con alcohol etílico al 70 % (v/v). Un mL de esta suspensión se llevó a un erlenmeyer con 100 mL de agua peptonada estéril. Seguidamente se realizaron 5 diluciones (1:10) seriadas en tubos de ensayo con 9 mL de solución de peptona estéril. Se prepararon placas con 1,0 mL de suspensión de los tubos 4 y 5.

Para la preparación de las placas se colocó la suspensión de células en el centro de la placa y luego se agregó el medio de cultivo (14-15 mL) acidificado con una temperatura de 44°C aproximadamente y se agitaron todas las placas de la misma forma y durante el mismo tiempo. Las placas sembradas se incubaron invertidas a 24 - 25°C por 48 h, al cabo de este período se contó el número de colonias por placas. Se seleccionaron las placas que tuvieron entre 30 y 300 colonias. La siembra de cada tubo de dilución se realizó por triplicado, informándose como valor promedio \pm desviación estándar.

Porcentaje de levaduras muertas

Para este ensayo la levadura prensada se colocó en frascos de polipropileno con tapas hermética y se congeló por 1, 40, 60 y 90 días. Pasado el período correspondiente se descongeló por 45 min a 30°C. La levadura prensada (3,0 g) fresca o congelada y descongelada fue suspendida en 100 mL de solución de peptona 0,1 % durante 5 min con agitación continua. Un mL de ésta suspensión se diluyó con 9 mL de solución de peptona y se agitó por 3 min. Este procedimiento de dilución se repitió dos veces. Una mezcla de 200 μ l de la suspensión de levaduras final y de 200 μ l de trypan blue 0,4 % (Sigma, Estados Unidos de América) se agitó por 3 min en vortex. Una gota de esta última suspensión se examinó en un microscopio óptico (lente de 20x) en una Cámara de Neubauer. Todas las células teñidas se contaron como muertas. Las

determinaciones se realizaron por duplicado, informándose como valor promedio \pm desviación estándar.

Lixiviado de células

Con el objetivo de poder caracterizar las sustancias liberadas por las células de levadura durante la congelación, se obtuvo un lixiviado de las levaduras. En este experimento la levadura prensada se colocó en frascos de polipropileno con tapas hermética y se congeló por 1, 40, 60 y 90 días. Pasado el período correspondiente las muestras se descongelaron por 45 min a 30°C. La levadura (10 g) fresca o congelada y descongelada se suspendió en 100 mL de agua destilada, con agitación constante durante 15 min. La suspensión se centrifugó durante 10 min a 1500 x g, y el sobrenadante se filtró mediante vacío, primero con un filtro de 1,0 μ m de tamaño de poro y luego con un filtro de 0,45 μ m estéril para eliminar todas las células de levaduras presentes. La solución filtrada se utilizó como lixiviado de las células de levaduras.

Análisis de los lixiviados de células

Extracción de las proteínas del gluten. Una alícuota de cada lixiviado (2,5 mL) se utilizó como solución de extracción de gluten vital (100 mg). Las mezclas se agitaron durante 5 min en vórtex, y se centrifugaron 10 min a 1000 x g. El precipitado se descartó y el sobrenadante se calentó en baño de agua a ebullición durante 5 min. Una alícuota del sobrenadante se tomó como extracto de gluten. Adicionalmente, se realizó una extracción con agua destilada como control.

Se determinó el contenido de nitrógeno de los lixiviados y de los extractos del gluten mediante el micrométodo de Kjeldahl modificado (Método 46-12, AACC 1995).

Se midió el contenido de sustancias reductoras totales de los lixiviados de acuerdo al método 10-01 (AACC 1995), para ello se realizó una extracción con ácido tricloroacético al 15 % (v/v), luego de centrifugar una alícuota del sobrenadante se incubó por 5 min en una solución de Iodo estandarizada. Finalmente, se tituló el exceso de I_2 con una solución de $Na_2S_2O_3$, usando almidón como indicador. La cantidad total de sustancias reductoras presentes es proporcional al consumo de I_2 .

Se determinó el pH de los lixiviados con un pHmetro Microprocessor CG 837 (Schott Geräte, Alemania).

Las proteínas de gluten solubilizadas por los lixiviados fueron analizadas mediante SDS-PAGE, con un gel apilador y uno separador (4 % y 12 % de acrilamida, respectivamente). Los geles se analizaron por densitometría como se describió anteriormente.

Los lixiviados de las células y los extractos de gluten también se analizaron por cromatografía de exclusión molecular (SEC). Una alícuota (200 μ L) de cada muestra filtrada (0,22 μ m de tamaño de poro) fue inyectada automáticamente por un cromatógrafo líquido de presión media AKTA Explorer 100 (Pharmacia Biotech, Estados Unidos de América) en una columna Superdex 200 HR 10/20 (Pharmacia Biotech, Estados Unidos de América). La solución de elución utilizada fue buffer fosfato 0,05 M (pH 7,6) con 0,15 M de NaCl (sonicada, filtrada por 0,45 μ m de tamaño de poro y degaseada bajo vacío). La velocidad de flujo fue de 0,40 mL/min. La absorbancia fue medida a 210 nm (Singh et al 1990). Los volúmenes de elución y las áreas de los picos fueron cuantificados con el programa Unicorn Version 2.30 software (Pharmacia Biotech, Estados Unidos de América).

Se elaboró pan reemplazando parte del agua de la formulación por los lixiviados de levaduras en la cantidad correspondiente a la levadura usada (30 mL de lixiviado cada 100 g de harina), siguiendo el método mencionado y se determinó el volumen, el peso y la relación de forma de los panes obtenidos.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tratados estadísticamente mediante análisis de varianza y las medias fueron comparadas por el Método de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher a un nivel de significación de 0,05. Estos análisis se realizaron utilizando el programa de estadística INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las relaciones entre los parámetros medidos fueron evaluadas por el método de Pearson (Connover 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMERA SECCIÓN

CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA

UTILIZADA PARA LA ELABORACIÓN DE MASA

Análisis físico-químicos

En la Tabla 1.1 se muestran las características de la harina utilizada (valores promedios de todos los lotes utilizados durante el desarrollo del trabajo de tesis).

Tabla 1.1. Características de las partidas de harinas utilizada para la fabricación de pan.

Análisis químicos	
Proteínas (%)	12,9
Humedad (%)	13,4
Cenizas (%)	0,75
Parámetros alveográficos	
Trabajo de deformación (10^{-4} J)	276
P (mm)	102,3
L (mm)	75,3
Coefficiente P/L	1,50
G (mL)	19,1
Parámetros farinográficos	
Absorción de agua (%)	69,4
Tiempo de desarrollo (min)	11,2
Estabilidad (min)	7,3
Aflojamiento (UB)	135
Glutomatic	
Gluten (%)	29,5
Tiempo de caída	
Tiempo (s)	336,0

Los distintos lotes utilizados provienen de harinas fuertes, aconsejadas para ser mezcladas con harinas más débiles, como se refleja en los altos valores de proteínas y gluten húmedo, en el trabajo de deformación, coeficiente P/L, absorción de agua y tiempo de desarrollo.

El tiempo de caída refleja una harina que proviene de un grano no germinado con una débil actividad amilásica.

Difracción de rayos-X

El almidón de trigo es sintetizado dentro de gránulos en estado semicristalino con varios tipos de formas polimórficas y grados de cristalinidad. La organización del gránulo es muy compleja y depende del origen botánico. Pese a que se han dedicado varias décadas de investigación, numerosas preguntas permanecen aún sin resolver, como por ejemplo cual es la contribución respectiva de la amilosa y la amilopectina a la cristalinidad, la distribución de áreas con orden y desorden en el gránulo, la distribución del tamaño de las áreas cristalinas o la organización de los patrones (A y B) mezclados en el gránulo (Buleón et al 1998).

Se asume, usualmente, que la amilopectina soporta el esqueleto de las regiones cristalinas en el gránulo de almidón. El modelo actualmente aceptado para la conformación de la amilopectina es el “racemoso” o de “clusters”, que permite explicar que la estructura cristalina no es severamente interrumpida en los puntos de ramificación y la presencia de zonas cristalinas (arreglos de doble hélice formadas por pequeñas cadenas) y amorfas (zonas de ramificación densa) (Zobel 1988a, Zobel et al 1988).

La conformación de la amilosa libre en el gránulo de almidón nativo no se conoce exactamente, aunque podría estar parcialmente envuelta en dobles hélices con pequeñas cadenas de amilopectina en las regiones cristalinas. Por otra parte, ya que la cristalinidad tipo-V es raramente detectada en almidones nativos, las cadenas de amilosa podrían estar envueltas en complejos amilosa - lípido formando parte de la región amorfa (hélices simples donde se incluyen las moléculas acomplejantes) o en arreglos demasiado limitados para mostrar un diagrama de difracción,

que pueden reorganizarse en estructuras cristalinas detectables en presencia de calor y humedad (Buleón et al 1998).

Los gránulos de almidón nativo dan diferentes diagramas de difracción de rayos-X, dependiendo del origen botánico: patrón tipo A en almidones de cereales, patrón tipo-B en almidones de tubérculos y frutos y patrón tipo C en almidones de legumbres. Las características distintivas de cada alomorfismo son: el patrón A muestra tres picos intensos a 5,8; 5,2 y 3,8 Å; el patrón B muestra un pico a 15,8 Å, una línea ancha de intensidad media a 5,9 Å, una línea intensa a 5,2 Å y un doblete de intensidad media a 4,0 y 3,7 Å; el patrón C es igual que el A excepto por la adición de un pico de intensidad media a alta a 16,0 Å aproximadamente. La apariencia de esta última línea depende de la presencia de humedad, y puede desaparecer en muestras total o parcialmente secas. Existe controversia en considerar al patrón C una estructura separada, o si es una mezcla de las formas A y B. Se cuenta con información que indica que este tipo de almidón se obtiene bajo condiciones específicas y predecibles a partir de cualquiera de las otras dos formas, sin embargo parece tener suficiente libertad traslacional y de empaquetamiento lateral de las cadenas de almidón como para considerarse una forma separada. Otra estructura cristalográfica, denominada tipo-V, es observada típicamente en la fracción de amilosa como resultado de la formación de un complejo de inclusión. Los agentes complejantes incluyen, entre otros, alcoholes alifáticos, ácidos grasos, emulsionantes e iodo; éste último se reconoce visualmente por el color azul del complejo. Para la forma hidratada de este complejo, los picos en el espectro de difracción de rayos-X aparecen a 12,0; 6,8 y 4,4 Å; en la forma deshidratada, los picos se presentan a 11,3; 6,5 y 4,3 Å.

Cuando el almidón de trigo es calentado y dejado enfriar, como ocurre en la elaboración de pan, aparecen otras estructuras: la V que corresponde a la formación del complejo amilosa - lípido y la B producida por la cristalización de almidón fundido amorfo (Knightly 1977, Zobel 1988b, Zobel et al 1988, Jovanovich 1997, Buleón et al 1998).

La estructura cristalina y amorfa del almidón y la relación entre estas estructuras son los principales factores que determinan las propiedades de este polisacárido. Debido a que el pan es un gel concentrado de almidón, es importante poder caracterizarlo. En la Figura 1.1 se observa que el almidón presente en las harinas de trigo comercial usadas mostró un patrón de difracción tipo A, como la mayoría de los almidones provenientes de cereales (Zobel 1988b). Los picos de difracción se ubicaron a 2θ : 15,1; 17,1; 18,2 y 23,4°; correspondientes a una distancia interplanar de 5,86; 5,18; 4,87 y 3,85 Å, respectivamente.

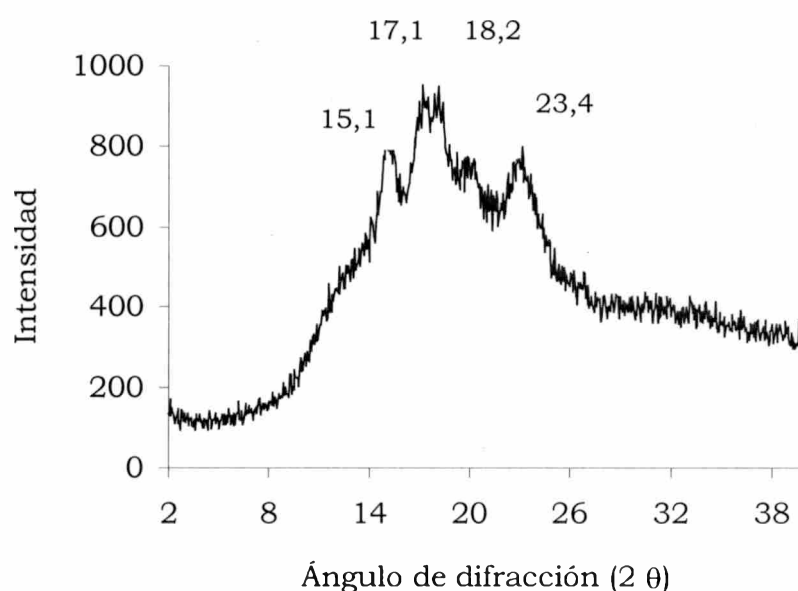


Figura 1.1. Difractograma de rayos-X de la harina utilizada en la elaboración de masas.

Proteínas de la harina de trigo

Cuando la harina de trigo es amasada con agua se forma una masa cohesiva y viscoelástica. Esta tiene la capacidad de retener gas durante la fermentación y al menos, parcialmente, de fijar la estructura durante el horneado. Ninguna harina de otro cereal es capaz de formar una masa de características similares. Estas propiedades especiales son atribuidas a la capacidad de las proteínas del trigo de formar gluten.

A efectos de caracterizar las proteínas presentes en las harinas a utilizar en este estudio se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las extracciones se hicieron con SDS y en presencia o ausencia de agente reductor (2-mercaptoetanol). La Figura 1.2 muestra los perfiles electroforéticos obtenidos.

Los perfiles de los extractos de proteínas sin reducir mostraron un chorreado de especies polipeptídicas a lo largo de todo el gel. Este chorreado fue causado, principalmente, por polímeros de gluteninas. Una gran cantidad de polímeros de elevado peso molecular fue incapaz de entrar al gel concentrador ("stacking", 4 % de acrilamida) y al separador (12 % de acrilamida), y quedaron retenidos en el inicio de los geles (bandas I2 y I1). Además se observaron algunas bandas de proteínas de masa molecular $231,0 \pm 2,5$; $86,2 \pm 0,1$; $71,3 \pm 0,4$; $64,4 \pm 0,5$; $58,5 \pm 0,5$; $46,2 \pm 0,0$; $35,1 \pm 0,2$; $30,3 \pm 0,0$ y $14,6 \pm 0,1$ kDa, identificadas con los números 1 a 8 (Figura 1.2a) respectivamente.

Las electroforesis de los extractos de proteínas realizadas en presencia de 2-mercaptoetanol exhibieron una serie de bandas proteicas bien definidas de masa molecular $123,1 \pm 1,0$; $96,8 \pm 0,9$; $84,5 \pm 0,2$; $62,4 \pm 0,1$; $58,5 \pm 0,1$; $43,0 \pm 0,2$; $36,2 \pm 0,1$; $34,1 \pm 0,1$; $32,2 \pm 0,2$; $28,4 \pm 0,3$; $25,9 \pm 0,2$; $21,6 \pm 0,2$; $17,4 \pm 0,0$ y $14,4 \pm 0,1$ kDa, identificadas con los números 1-14 (Figura 1.2b), respectivamente. En la Figura se dividió el gel separador en tres partes según la masa molecular de las especies presentes en cada una. El análisis densitométrico mostró que la parte superior, correspondiente a HMW - gluteninas, corresponde aproximadamente al 7,9 % del total de las proteínas sembradas en el gel; mientras que las partes siguientes, correspondientes a gliadinas - LMW - GS y albúminas - globulinas, representan el 55,2 y el 36,8 % del total de las proteínas respectivamente. El 2-mercaptoetanol produjo la depolimerización de las moléculas proteicas poliméricas debido a la escisión de los enlaces disulfuro. El perfil de las subunidades proteicas mostró que los polímeros, retenidos en el inicio de los geles y los que produjeron el efecto de chorreado en el gel sin agente reductor, estaban

formados por subunidades de gluteninas de masa molecular alta y media (bandas 1-6 y 9 de la Figura 1.2b). Las subunidades de gluteninas tienen la capacidad de formar puentes disulfuro intra e inter-cadena, mientras que las gliadinas sólo son capaces de formarlos dentro de una misma cadena. Esto se debe a la estructura de estas proteínas. Las gluteninas de masa molecular alta (HMW) contienen la mayoría de los residuos de cisteína en los dominios terminales, aunque también están presentes en el dominio central en algunas subunidades. Por otro lado, algunos tipos de gluteninas de masa molecular baja (LMW) contienen un residuo de cisteína extra que produce la unión covalente a los polímeros. Se ha postulado que estas subunidades actúan como terminadores de cadenas, ya que contienen un número impar de cisteínas. Por otro lado, las subunidades que contienen un número par de este aminoácido, actúan como prolongadores de cadena. Las ω -gliadinas no contienen residuos de cisteína por lo que sólo pueden interactuar con otros componentes del gluten y la masa por interacciones de tipo no covalentes. Las α -, β - y γ -gliadinas por su parte contienen residuos de cisteínas pero sólo pueden formar enlaces disulfuro dentro de la cadena polipeptídica, por lo que están impedidas de formar parte de los polímeros del gluten. Sin embargo estos enlaces son críticos para mantener el plegamiento de la estructura que determina la naturaleza de las interacciones no covalentes (Tatham 1995, Wrigley et al 1998).

La fracción de albúminas y globulinas (proteínas solubles) no sufrió cambios visibles por el agregado de 2-mercaptoetanol. Las principales proteínas en esta fracción son dos grupos de diferente tamaño, las de masa molecular alta (~ 60 kDa), y las de masa molecular baja (14 -16 kDa), determinados por SDS-PAGE. Esta fracción contiene la mayoría de las enzimas de la harina: amilasas (de gran importancia en el proceso de panificación), proteasas, fosfatasas, lipasas, etc. Existe poca información acerca de cómo esta fracción de proteínas afecta el proceso de elaboración de pan (Lindahl 1990, Pogna et al 1994).

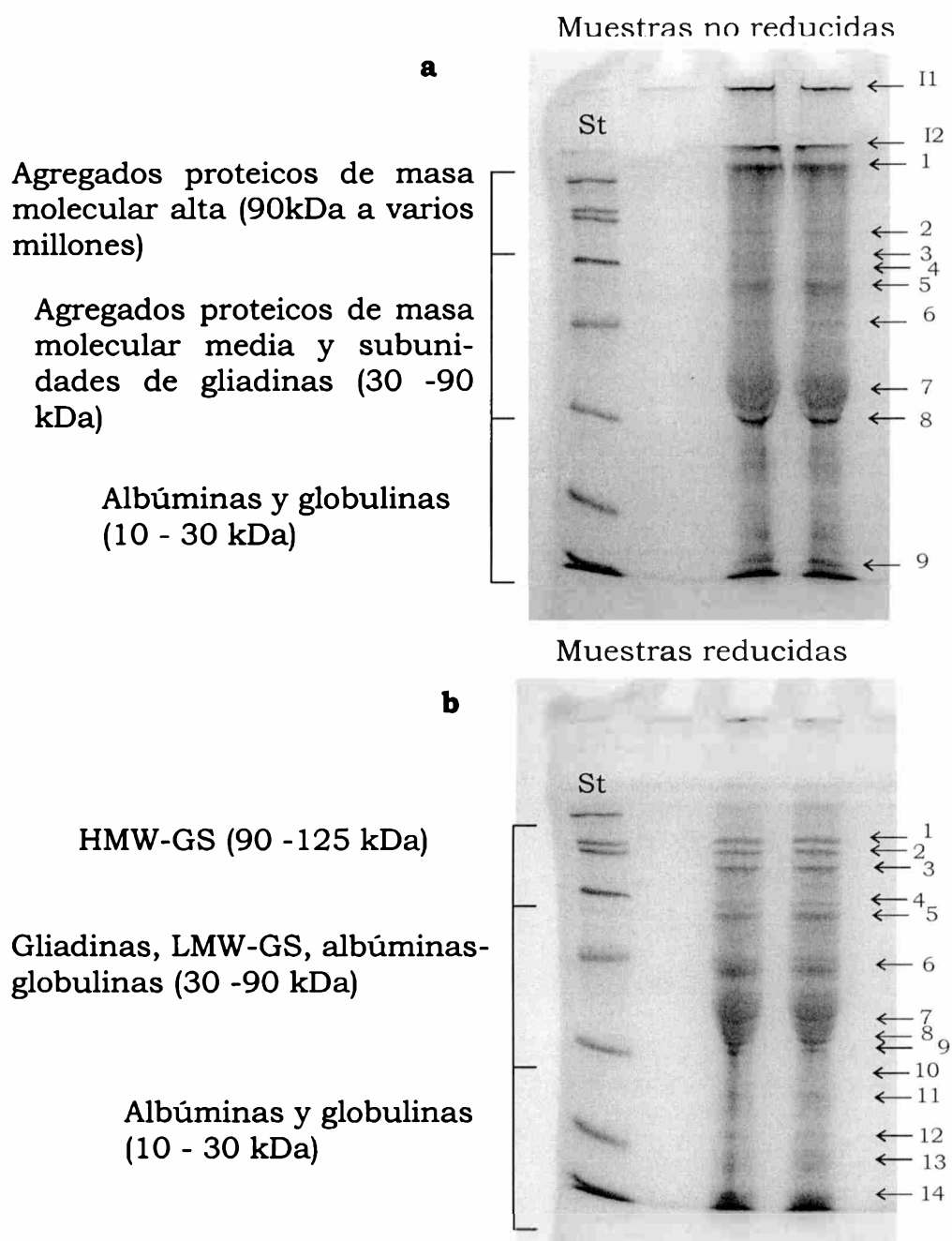


Figura 1.2. Patrones electroforéticos de las proteínas reducidas (a) y sin reducir (b) extraídas de dos lotes (1 y 2) de harina utilizada para la elaboración de masa. St: marcadores de peso molecular. HMW-GS: gluteninas de masa molecular alta, LMW-GS: gluteninas de masa molecular baja.

SEGUNDA SECCIÓN

EFFECTOS DEL PROCESO DE CONGELACIÓN DE LA MASA SOBRE LOS PARÁMETROS TECNOLÓGICOS, REOLÓGICOS Y MICROESTRUCTURALES

Efecto del tiempo de congelación de la masa sobre la calidad del pan

Se elaboró masa de pan según la formulación descrita en Materiales y Métodos, un lote se fermentó y horneó directamente (lote control), mientras que otro lote se congeló a -18°C . A distintos períodos de tiempo se descongeló, fermentó y horneó.

En la Figura 2.1 se muestra el efecto del proceso de congelación de la masa sobre el volumen de pan, donde se pone de manifiesto la disminución del volumen que sufre la hogaza de pan como consecuencia del tratamiento a temperaturas menores a 0°C . La pérdida de volumen fue mayor al aumentar el tiempo de almacenamiento de la masa en estado congelado, llegando a una disminución del 14,9 % del valor inicial (volumen del control) después de 60 días. Paralelamente, se produjo un aumento del tiempo de fermentación de la masa con el tiempo de almacenamiento a -18°C (Figura 2.2). Estos resultados son coincidentes con los publicados por otros autores (Hsu et al 1979a, Neyreneuf y Van Der Plaat 1991, Inoue y Bushuk 1991, Inoue y Bushuk 1992, Nemeth et al 1996, Kenny et al 1999, Lu y Grant 1999, Le Bail et al 1999, Kenny et al 2001).

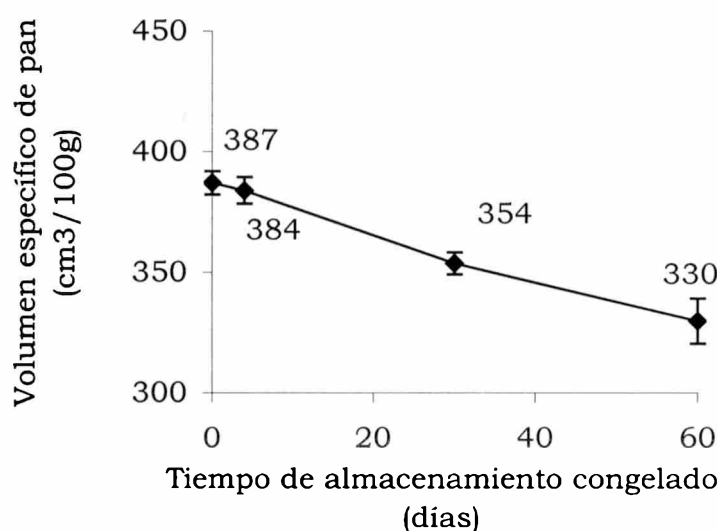


Figura 2.1. Efecto del proceso de congelación de masa sobre el volumen de pan.

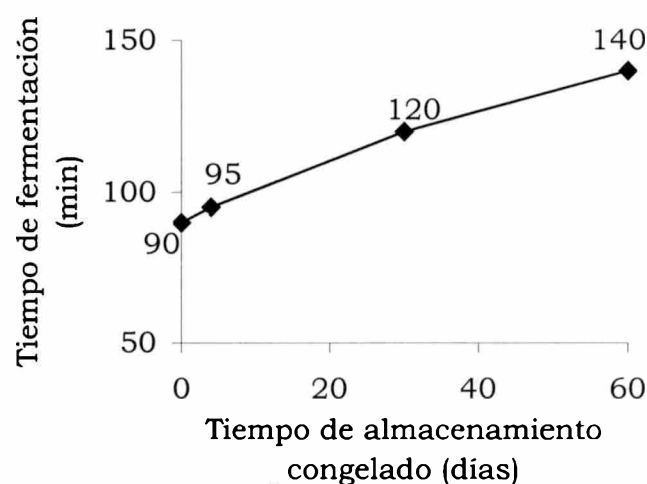


Figura 2.2. Efecto del proceso de congelación de masa sobre el tiempo de fermentación.

La relación entre el alto y el ancho de la hogaza de pan (A/D : factor de forma) provee información sobre los cambios en la elasticidad de la masa, ya que masas más elásticas retienen mejor su forma durante los procesos de descongelación y fermentación final (Rasanen et al 1997a, Sahlstrom et al 1999). La Figura 2.3 muestra el efecto de la congelación de la masa sobre la relación entre el alto y el diámetro de la hogaza de pan. La masa no congelada produjo panes con un coeficiente más alto que las masas congeladas y almacenadas por cualquier período de tiempo. Esto indica una pérdida de elasticidad de las masas como consecuencia de la congelación y almacenamiento en estado congelado. Rasanen et al (1997a) encontraron resultados similares.

En la Figura 2.4 se presenta el efecto de la congelación de la masa sobre el área relativa de alvéolos de la hogaza de pan. Las masas congeladas en los períodos de tiempo analizados muestran un mayor valor del área porcentual de celdas que las masas que no fueron congeladas, es decir, que el pan obtenido a partir de masas congeladas posee una estructura con mayor proporción de alvéolos. Estos datos coinciden con los publicados por Wolt y D'appolonia (1984b), quienes examinando visualmente la apariencia externa e interna de los panes, concluyeron que

el almacenamiento en estado congelado produce una estructura de miga más abierta en los panes.

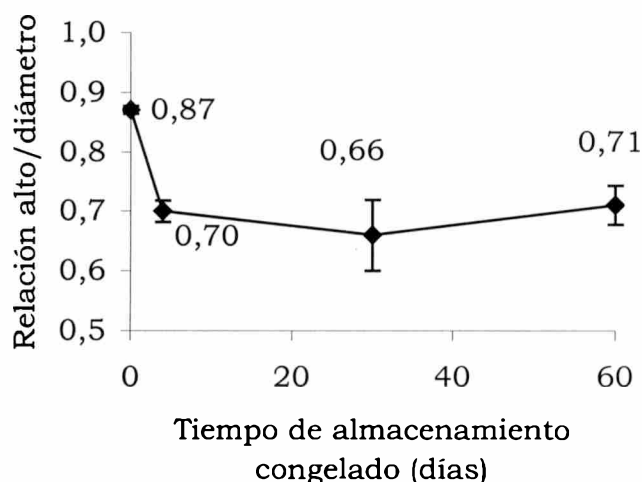


Figura 2.3. Efecto del proceso de congelación de la masa sobre la relación alto/diámetro de los panes.

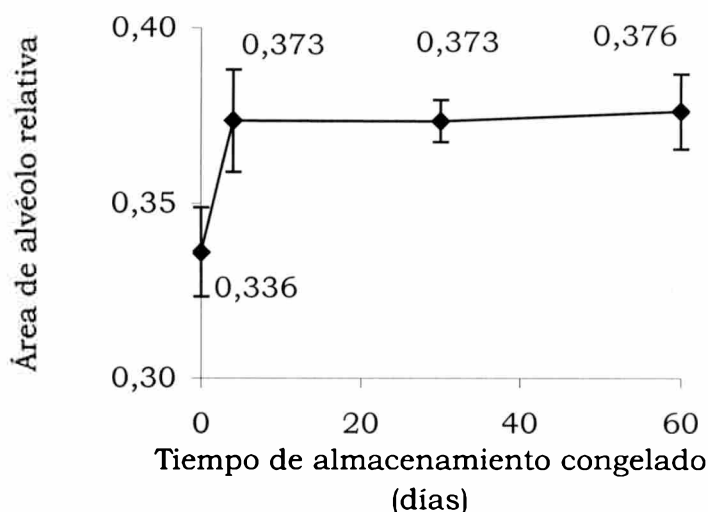


Figura 2.4. Efecto del proceso de congelación de la masa sobre el área de alvéolos de los panes.

En las Figuras 2.5 y 2.6 se observa la estructura interna y la apariencia externa de los panes obtenidos a partir de masa no congelada (0 d) y congelada por 30 y 60 días. La congelación de la masa produjo

panes de estructura interna más abierta y menos homogénea, probablemente debido a una fermentación más extensa y menos uniforme por el proceso de descongelación - fermentación. La congelación también produjo cambios en la apariencia externa, manifestándose en una falta de uniformidad en la forma, el color de la hogaza y la aparición de pequeñas ampollas. Estos últimos defectos se producen porque la masa al descongelarse está más fría que el aire que la rodea, en consecuencia se condensa gran cantidad de agua sobre su superficie. Más tarde, durante el horneado las partes de la superficie demasiado húmedas producen una decoloración indeseable y ampollado (Brümmer 1995, Lorenz y Kulp 1995).

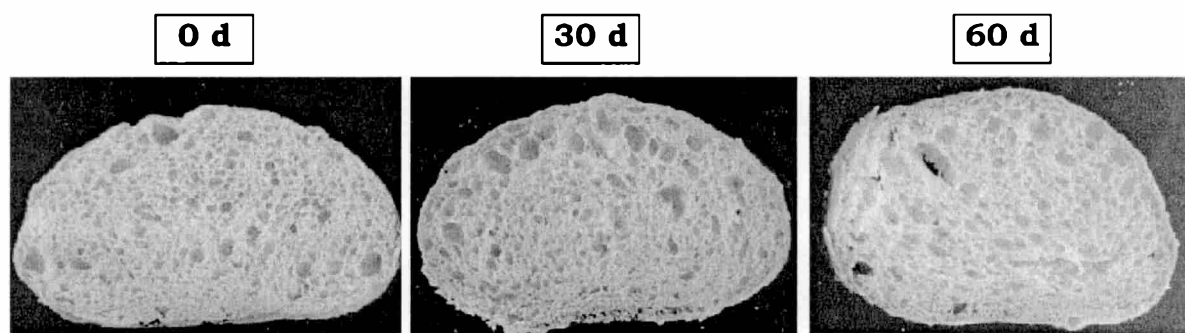


Figura 2.5. Aspecto interno de los panes obtenidos a partir de masa fresca y congelada por 30 y 60 días.

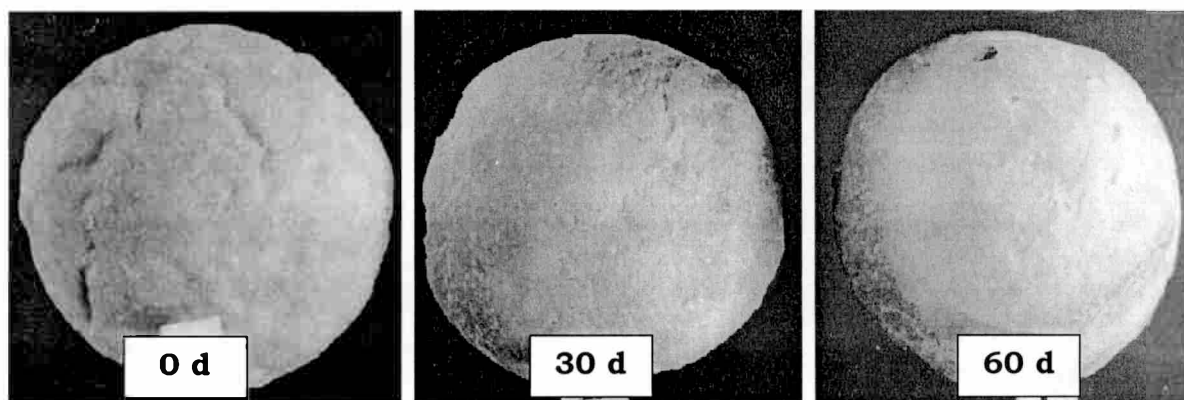


Figura 2.6. Aspecto externo de los panes obtenidos a partir de masa fresca y congelada por 30 y 60 días.

El deterioro gradual de la calidad de los panes obtenidos de masas congeladas observado en este trabajo, tales como menor volumen de pan, tiempos de fermentación más largos, pérdida de la capacidad para mantener su forma durante el proceso de descongelación, la fermentación y el horneado, y mayor deterioro de la textura final, se deben principalmente a una disminución de la fuerza de la masa y a la pérdida gradual de la actividad y viabilidad de las levaduras (Inoue y Bushuk 1992, Stauffer 1993, Casey y Foy 1995). El debilitamiento de la masa de pan durante el almacenamiento a -18°C puede deberse a un incremento en la liberación de sustancias reductoras por las levaduras durante el proceso de congelación, lo que causaría una reducción de las proteínas del gluten, o a una redistribución del agua causada por un cambio en la capacidad de ligar agua de los constituyentes de la masa; o quizás a ambos factores actuando en forma conjunta (Kline y Sugihara 1968, Hsu et al 1979a, Inoue y Bushuk 1991). Otros autores postularon que los cambios estructurales en masas congeladas y descongeladas no están asociados con la liberación de sustancias reductoras de células de levadura muertas. En cambio sugieren, una pérdida de entrecruzamiento en el gluten por el proceso de congelación. La causa directa de este cambio en el gluten se debería a la ruptura de ciertos enlaces por la acción mecánica de los cristales de hielo (Varriano-Marston et al 1980, Wolt y D'apponia 1984a, Autio y Sinda 1992).

Esta falta de acuerdo sobre las causas que provocan el deterioro de la calidad de los panes elaborados a partir de masas congeladas se abordará con mayor profundidad en la próxima sección.

Efecto del tiempo de congelación de la masa sobre la velocidad de endurecimiento de la miga de pan

El desarrollo de la dureza de la miga con el tiempo es un fenómeno en el que influyen diversos factores. La pérdida de humedad de la miga junto con la recristalización del almidón son los dos mecanismos admitidos como básicos. El mecanismo más ampliamente aceptado fue

propuesto por Schoch y French en 1947, según estos autores el almidón es el principal responsable del endurecimiento. Las moléculas de amilosa difundidas al exterior de los gránulos durante la cocción interaccionan durante el enfriamiento, de forma que en el pan fresco queda un gel firme de amilosa en el que se sitúan los gránulos en cuyo interior están las cadenas ramificadas de la amilopectina. En el almacenamiento, el endurecimiento se produce por la formación de asociaciones entre cadenas de amilopectina.

Para analizar el efecto de la congelación de la masa sobre la velocidad de endurecimiento de la miga se trabajó con dos lotes de panes, uno obtenido a partir de masa congelada por 60 días, y el segundo de masa sin congelar. Los panes se envasaron en películas de polietileno, y se almacenaron a dos temperaturas, $3^{\circ}\text{C}\pm 1$ y $20^{\circ}\text{C}\pm 2$. A distintos tiempos de almacenamiento (0, 1, 3 y 7 días) se tomaron 3 panes y se obtuvieron dos rodajas de la parte central de cada uno tal como se describió en Materiales y Métodos. Cada rodaja de pan se sometió a compresión. Las Figuras 2.7 y 2.8 muestran la velocidad de endurecimiento (firmeza vs. tiempo de almacenamiento) de la miga de pan a $3 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ respectivamente.

En todos los casos la firmeza aumentó significativamente con el tiempo de almacenamiento del pan, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las masas congeladas y las no congeladas. Las curvas, a ambas temperaturas, mostraron un rápido incremento en la firmeza en el primer día de envejecimiento. Este desarrollo temprano de la dureza se atribuye al hecho que la amilosa solubilizada en el gel forma hélices dobles. El endurecimiento posterior está asociado a la recristalización de la amilopectina (Zobel y Kulp 1996).

Por otro lado, también se observó que la temperatura de almacenamiento influyó en la velocidad de endurecimiento de los panes. Los panes almacenados a 3°C endurecieron más rápidamente y tuvieron una mayor dureza al cabo de 7 días de almacenamiento. Según algunos investigadores un menor aumento de la firmeza estaría relacionado con una cristalinidad más baja del almidón (Zobel y Kulp 1996).

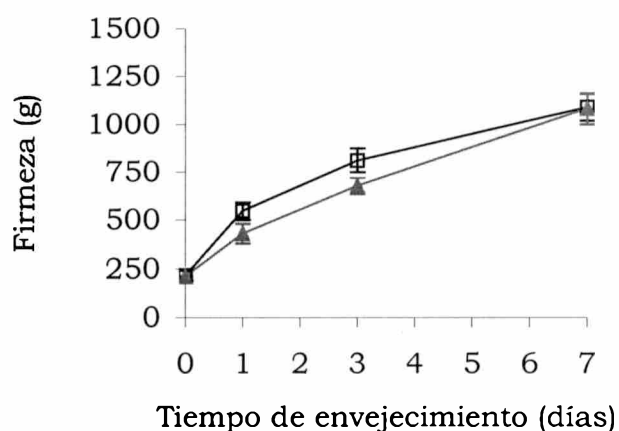


Figura 2.7. Variación de la firmeza de la miga de pan almacenada a 20°C obtenido de masa congelada (-▲-) y no congelada (-□-).

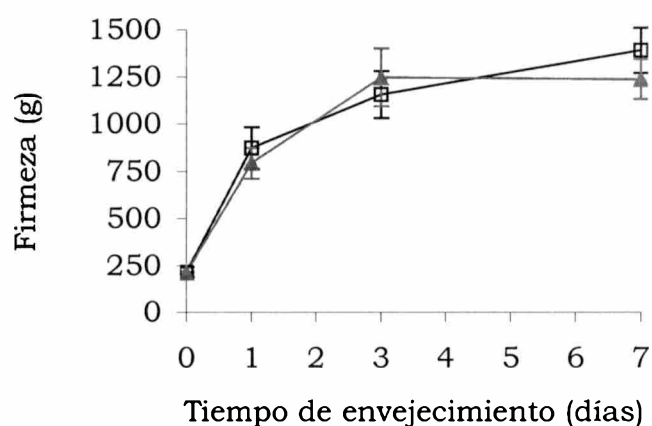


Figura 2.8. Variación de la firmeza de la miga de pan almacenada a 3°C obtenido de masa congelada (-▲-) y no congelada (-□-).

Efecto de la temperatura de congelación y descongelación de la masa

La congelación de la masa reduce considerablemente la actividad de las levaduras, las enzimas, los microorganismos y los procesos oxidativos. Para lograr estos efectos la temperatura del centro de la masa debería estar por debajo de -15 ó -18°C. Este proceso trae aparejado un gran

número de problemas. Pese a que la temperatura de congelación del citoplasma es aproximadamente -1°C , la célula permanece sin congelar, y en consecuencia subenfriada, hasta -10 o -15°C , aún cuando el hielo está presente en el medio externo. El agua subenfriada dentro del citoplasma tiene una presión de vapor más alta que el hielo que rodea la membrana, y la célula comienza a equilibrar esta diferencia de presión perdiendo agua a través de la membrana celular. Esta deshidratación produce la concentración de los solutos en el interior de las células y disminuye la presión de vapor del agua intracelular. El movimiento de agua establece un equilibrio entre el interior de la célula y sus alrededores, sólo si la temperatura es reducida por debajo de -15°C puede comenzar la formación de cristales de hielo dentro del citoplasma. La cantidad de agua removida de la célula es dependiente del tiempo en que la célula se mantiene entre -1 y -15°C (período que dura el equilibrio mencionado). Si la velocidad de enfriamiento es demasiado rápida y la célula contiene agua subenfriada, cuando la temperatura cae por debajo de los -15°C , el equilibrio se completa por la congelación intracelular. Los eventos producidos durante el proceso de congelación de las células dependen de la velocidad de enfriamiento y de la permeabilidad de la membrana.

La célula está sujeta a una segunda clase de eventos físico-químicos. A medida que la temperatura se reduce la cantidad de agua de la célula disminuye, los solutos extra e intracelulares se concentran, ocurren cambios de pH porque los solutos precipitan a medida que sus solubilidades son excedidas, y todos los solutos precipitan por debajo del punto eutéctico del sistema. Mientras más largo es el período de enfriamiento mayor tiempo de exposición de la célula a estos efectos (denominados “efectos de solución”). Varios mecanismos han sido propuestos para explicar el daño de los efectos de solución sobre las células. Altas concentraciones de electrolitos, producidos por la congelación, afectan los lípidos de la membrana, haciéndola más permeable, consecuentemente la célula sufre un golpe osmótico como resultado de la entrada de agua durante la descongelación. Ciertas

células, son incapaces de encogerse por debajo del 50 % de su volumen normal. La disminución del volumen establece un gradiente de presión transitorio a través de la membrana lo que hace permeable a la célula (Meryman 1968). Otros investigadores (Franks et al 1983) sugirieron que altas concentraciones de sales causan daños a la membrana celular y la desnaturalización de las proteínas como resultado de los cambios de pH.

Por debajo del punto eutéctico, en estado sólido, puede ocurrir recristalización de hielo. Los pequeños cristales de hielo, tienden a reducir sus altas energías superficiales, creciendo o uniéndose con otros cristales pequeños, formando cristales más grandes con menores energías superficiales. La velocidad a la cual ocurre la recristalización depende del tamaño de cristal formado durante el proceso de congelación y la temperatura a la que son expuestos. Un enfriamiento rápido produce pequeños cristales de hielo, los cristales que se forman dentro de las células tenderán a recristalizar durante el almacenamiento y el calentamiento, particularmente si este último proceso es lento.

Las investigaciones realizadas hasta el presente sugieren que el efecto letal en un enfriamiento rápido de las células de levadura es el crecimiento de los cristales intracelulares en lugar de su formación inicial. Se especula que el daño ocurre porque la recristalización produce suficiente fuerza para romper la membrana plasmática o la membrana de organelas como la mitocondria.

Los efectos de solución son responsables del daño celular cuando la velocidad de enfriamiento es más baja que la óptima, en cambio, la congelación intracelular es responsable cuando el enfriamiento es demasiado rápido. La velocidad de enfriamiento óptima debería ser lo suficientemente baja para prevenir la formación de hielo intracelular, pero lo suficientemente rápida para minimizar el tiempo de exposición de la célula a los efectos de solución (Mazur 1965, Mazur 1970, Hsu et al 1979b, Casey y Foy 1995). La formación de cristales y la recristalización de hielo pueden, además, inducir daño en la red tridimensional de

proteínas de la masa y afectar las propiedades de retención de gas y la fuerza de la misma.

En el presente trabajo, se analizaron dos velocidades de congelación, colocando la masa a -18°C (velocidad de enfriamiento: $0,15^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y, sumergiéndola en aire líquido (-90°C aproximadamente) durante 90 s (velocidad de enfriamiento: $27^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Posteriormente, las masas se almacenaron a -18°C por 18 días. La masa congelada en aire líquido mostró un cambio muy pequeño de volumen durante la fermentación, mientras que la masa congelada a -18°C duplicó su volumen. Los panes obtenidos a partir de masas congeladas a -18°C presentaron un mayor volumen (367 cm^3) que los elaborados con masas congeladas a -90°C (174 cm^3). La congelación en aire líquido fue demasiado rápida y produjo un gran porcentaje de muerte celular debido a la formación de cristales de hielo intracelulares en las células de levaduras. Hsu et al (1979b) obtuvieron resultados similares trabajando a -20 , -40 y -78°C (velocidad de enfriamiento: $0,57$; $1,94$; y $5,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ respectivamente).

Por otra parte, se analizaron dos métodos de descongelación: a) las piezas de masa congelada se retiraron de la cámara a -18°C y se colocaron embolsadas por 12 h a $3 \pm 1^{\circ}\text{C}$, luego se dejaron por 1 h a temperatura ambiente ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$); b) las piezas se retiraron de la cámara a -18°C , se sacaron del envoltorio y se mantuvieron por 1 h a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Las masas se fermentaron a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en cámara con alta humedad relativa, hasta obtener el desarrollo óptimo, tiempo a partir del cual disminuyó la velocidad de incremento del volumen. Los panes obtenidos a partir de masas congeladas por 30 días y descongeladas por 12 h a $3 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y 1 h a $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ presentaron un volumen levemente mayor (386 cm^3) que las obtenidas por el método más rápido (360 cm^3). Por el contrario, Holmes y Hoseney (1987) obtuvieron mayor volumen de pan mientras más alta fue la temperatura durante el proceso de descongelación. Estas diferencias pueden ser atribuidas a diferencias en la formulación y en el procesamiento de las masas usadas en esta trabajo.

Comportamiento viscoelástico de la masa

La masa, como material viscoelástico, presenta propiedades intermedias entre un sólido perfectamente elástico y un fluido perfectamente viscoso. El comportamiento reológico de una masa es considerado generalmente no lineal y las componentes elásticas y viscosas tienen que ser determinadas en función de la deformación y de la velocidad de la deformación, dado que la relación entre fuerza y deformación y entre fuerza y velocidad de deformación no son constantes. Muchos estudios han mostrado que la masa puede tener un comportamiento viscoelástico lineal a bajas deformaciones en ensayos oscilatorios (Hoseney 1994a, Petrofsky y Hoseney 1995, Masi et al 1998, Miller y Hoseney 1999).

Las propiedades viscoelásticas de las masas son el resultado de una fase continua de proteínas, que en una masa completamente desarrollada, rodea los gránulos de almidón. Los gránulos hacen el material más rígido y probablemente, afectan las propiedades de la masa mediante sus interacciones (Bloksma 1971). El comportamiento reológico del gluten depende de las propiedades moleculares de los componentes que interactúan y del tipo de enlaces que involucra la matriz polimérica. De acuerdo a Bushuk y MacRitchie (1987), la fuerza de la red polimérica se atribuye a la concentración y fuerza de los enlaces entre las cadenas, la masa molecular de las regiones que interactúan, la masa molecular promedio y la distribución de masas moleculares de los polímeros constituyentes.

Se realizaron ensayos a efectos de caracterizar la masa por medio de medidas oscilatorias dinámicas.

La Figura 2.9 muestra la variación del módulo complejo con la deformación en masa no congelada. Las muestras presentaron viscoelasticidad lineal por debajo del 3 % de deformación. En

consecuencia se tomó este valor como deformación límite para los ensayos dinámicos de barrido de frecuencia.

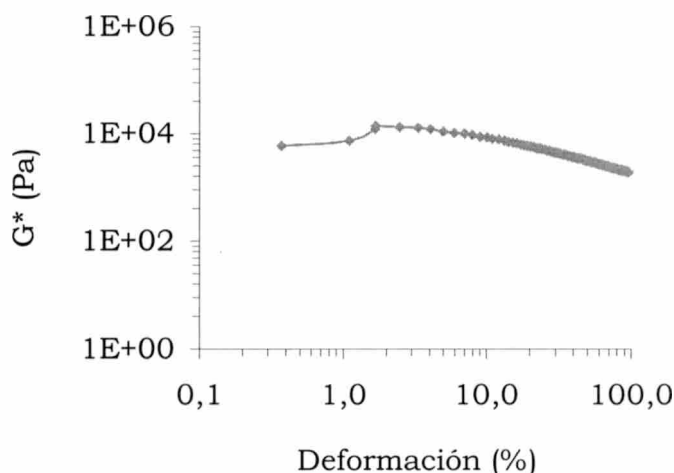


Figura 2.9. Variación del módulo complejo G^* con la deformación para masa sin congelar.

El análisis de los módulos elástico y viscoso versus la frecuencia de oscilación de masas congeladas y no congeladas (Figura 2.10) reveló que el comportamiento viscoelástico corresponde al de un material tipo gel, dado que el valor de G' es mayor que G'' en todo el rango de frecuencia ensayado (Giboreau et al 1994). Según el modelo empírico de Ross-Murphy (1995) el comportamiento de G' y G'' que presentó este material también lo clasifica como gel; de acuerdo a este mismo autor el cambio de la η^* con la frecuencia obtenido corresponde a un gel fuerte.

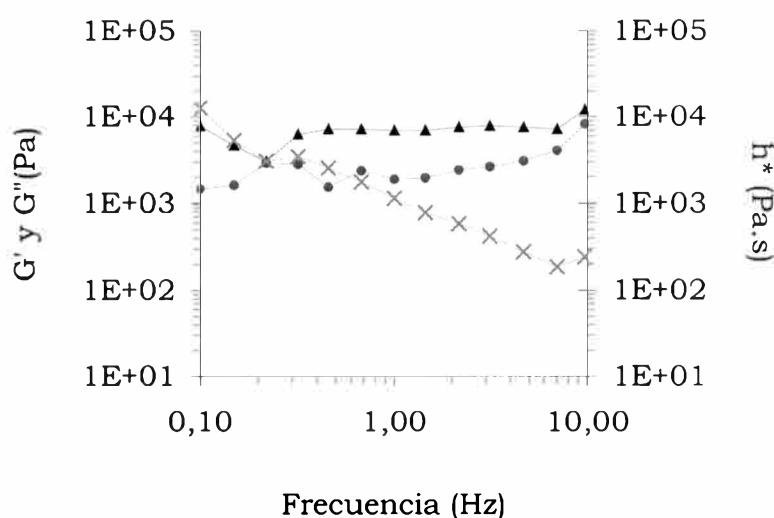


Figura 2.10. Comportamiento viscoelástico de masa no congelada G' (-▲-) G'' (-●-) y η^* (-x-).

Efecto del proceso de congelación de la masa sobre el comportamiento viscoelástico

La Figura 2.11 presenta la variación del módulo complejo (G^*), del módulo elástico (G') y de la viscosidad compleja (η^*) en masas congeladas y no congeladas. Los diagramas obtenidos de masas congeladas por 1, 60 y 120 días muestran que se produce poca variación en el comportamiento reológico de las mismas, mientras que a 240 días de congelación se observó una gran caída de los valores de estos parámetros.

La Tabla 2.1 muestra el efecto de la congelación de la masa sobre los parámetros viscoelásticos medidos a 1 Hz. Los valores del módulo complejo, el módulo elástico y la viscosidad compleja disminuyeron con el tiempo de almacenamiento a -18°C , mostrando una pérdida de la resistencia total y de la elasticidad de la estructura de la masa. La caída de los valores fue más evidente a partir de los 120 días de almacenamiento. Estos resultados concuerdan con los publicados por Autio y Sinda (1992).

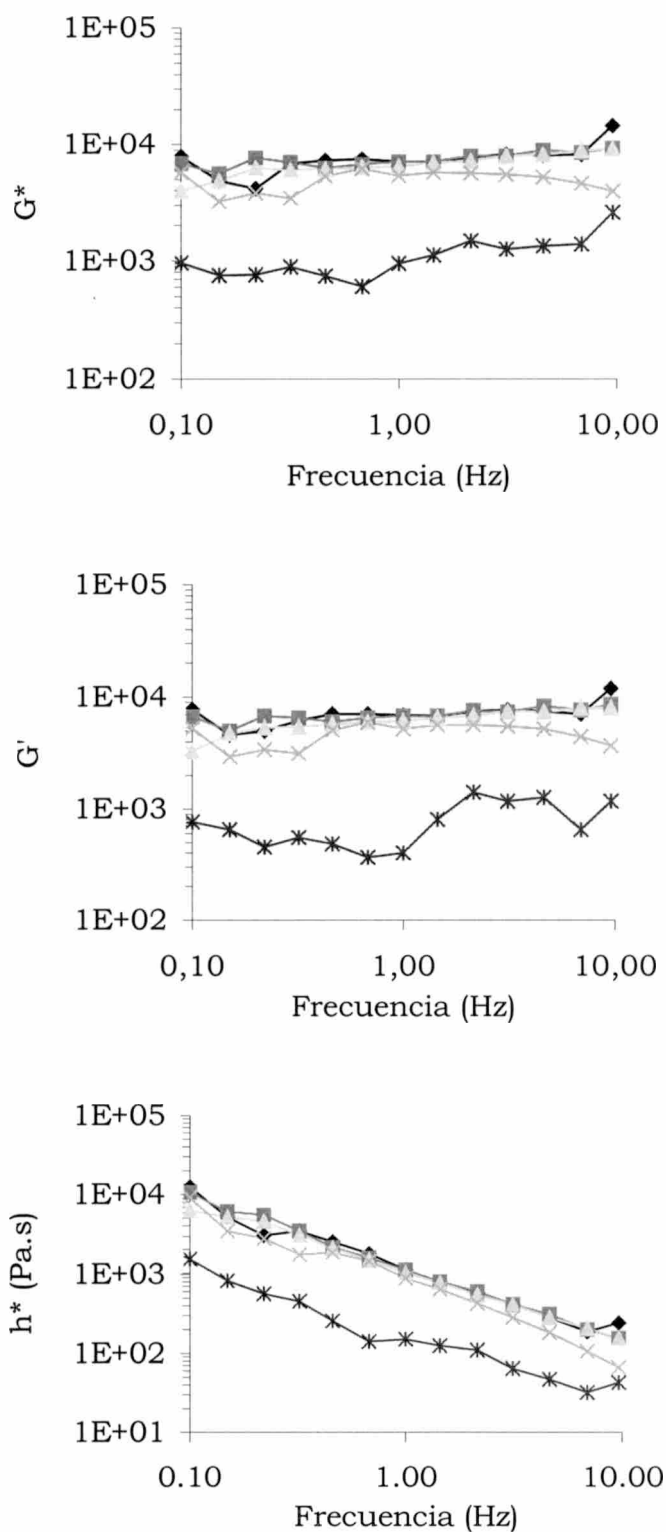


Figura 2.11. Efecto del tiempo de congelación de las masas sobre G^* , G' y η^* . Masa no congelada (\blacklozenge), masas congeladas por 1 día (\blacksquare), por 60 días (\blacktriangle), por 120 días (\bullet) y por 240 días ($*$).

Wrigley et al (1998) postularon que el debilitamiento de la masa asociado con la ruptura de los puentes disulfuro, está acompañado por una disminución de la masa molecular de las fracciones proteicas que forman el gluten. La disminución del módulo de almacenamiento, G' , debida a los procesos de congelación y descongelación podría ser atribuida a una pérdida de enlaces entre los polímeros de proteínas. La ruptura de enlaces entre proteínas podría causar la depolimerización de grandes agregados proteicos. Esto hecho es coincidente con los resultados obtenidos respecto a la depolimerización de proteínas que se encontraron por SDS-PAGE y que se mostrará y discutirá en la Sección III.

Tabla 2.1. Variación del módulo complejo (G^*), el módulo elástico (G') y la viscosidad compleja (η^*) con el tiempo de congelación de la masa ($f=1$ Hz). Masa sin fermentación.

Tiempo de almacenamiento (días)	G^* [Pa]	G' (Pa)	η^* [Pa.s]
0	7124	6872	1134
1	7107	6782	1131
60	6453	6091	1027
120	5389	5188	858
240	946	402	151

El agregado de levadura a la masa tiene varias funciones, además de la contribución al volumen de pan a través de la producción de CO_2 , influye sobre la textura de la masa, contribuye al aroma y el sabor, y mejora el valor nutricional del pan. Junto con el CO_2 y el alcohol etílico, metabolitos principales del proceso fermentativo, se encuentran siempre otros componentes. Entre estos últimos, tiene una importancia destacada

la glicerina, a partir de la cual se puede formar acetaldehído dependiendo de las condiciones del proceso de fermentación y de la producción de sustancias aptas para bloquear este compuesto, como las alcohólicas. También, se forman otros alcoholes polivalentes y monovalentes por el metabolismo proteico de las levaduras, y se producen otros aldehídos y ácidos tales como ácido fórmico, acético, succínico y láctico. Además de la fermentación alcohólica se producen, en mayor o menor medida, otras fermentaciones por acción de ciertos microorganismos, que conducen a la formación de ácido láctico, acético y butírico (Quaglia 1991b).

La fermentación tiene numerosos efectos sobre la red de gluten, cuando el CO₂ se disuelve en la fase acuosa disminuye el pH de la masa. Por otro lado, las células de levadura producen una gran cantidad de componentes extracelulares que influyen en el comportamiento de la estructura de la masa, tales como el alcohol y el glutatión; este último es una sustancia reductora que afecta las reacciones de óxido - reducción de las proteínas del gluten. Además, la expansión de las celdas de gas, formadas durante el amasado, produce un trabajo físico sobre la masa (Eliasson y Larsson 1993b).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las masas congeladas por 1, 60 y 120 días, y no congeladas que fueron fermentadas (Tabla 2.2) antes de ser analizadas en el reómetro presentaron valores menores de G^* , G' y η^* que las que no fueron fermentadas (Tabla 2.1). Lo que indica que la fermentación de la masa provocó una caída en la consistencia y la elasticidad de la masa. Kline y Sugihara (1980) encontraron que la presencia de levaduras produjo masas con menor resistencia a la extensión y mayor extensibilidad que las masas sin levaduras. Es posible un debilitamiento del gluten debido a la acción de reductasas de las levaduras sobre el gluten (Cooper y Reed 1968). Por otro lado, Cullen-Refai et al (1988) utilizando un sistema de comprensión uniaxial, encontraron que las masas con una fermentación completa fueron más elásticas que las fermentadas parcialmente. Estos autores trabajaron con masas elaboradas a partir de una formulación más

compleja (que incluyó azúcar, margarina y leche en polvo descremada) que la empleada en este trabajo y utilizaron un proceso de elaboración de masa con tres períodos de fermentación seguidos del laminado.

Tabla 2.2. Variación del módulo complejo (G^*), el módulo elástico (G') y la viscosidad compleja (η^*) con el tiempo de congelación de la masa ($f=1$ Hz). Masa con fermentación

Tiempo de almacenamiento (días)	G^* [Pa]	G' (Pa)	η^* [Pa.s]
0	5351	5129	852
1	6787	6450	1080
60	4997	4708	795
120	4149	4063	660
240	1188	642	189

La masa congelada por 240 días exhibió valores de G^* , G' y η^* similares antes y después del proceso de fermentación, quizás debido a que el largo proceso de congelación provocó un gran deterioro estructural y a que el número de células de levaduras viables presentes en la masa es muy bajo, según se infiere de los datos obtenidos sobre la supervivencia de las levaduras durante el proceso de congelación (Sección III).

Las masas congeladas, descongeladas y fermentadas también mostraron una disminución de los parámetros viscoelásticos con el tiempo de almacenamiento en estado congelado.

Efecto del proceso de congelación de la masa sobre la microestructura

La microestructura de la masa fue estudiada previamente por microscopía electrónica de barrido (SEM). Algunos autores utilizando diferentes técnicas de preparación de muestra, han descrito la estructura de la masa como una matriz, la red de gluten, donde los gránulos de almidón se encuentran dispersos (Berglund et al 1991, Schluentz et al 2000, Rojas et al 2000).

En la Figura 2.12 se muestran distintas fotografías de la microestructura de masa no congelada (a, c, e, g) y masa congelada por 60 días (b, d, f, h) a diferentes aumentos (600x: a y b, 1500x: c y d; 3600x: e y f; y 10000x: g y h).

Las microfotografías muestran claramente los gránulos de almidón (A) inmersos en la red de gluten (P). En las fotografías de mayor aumento se observa con más detalle la red formada por las proteínas (Figura 2.12 g y h).

Las masas congeladas por 60 días mostraron una estructura dañada. Las hebras de gluten se presentaron más porosas y finas, y menos uniformes. En las microfotografías de mayor aumento (1500x, 3600x y 10000x) correspondientes a masas congeladas se pudieron observar pequeños trozos de material de color blanco (indicados con flechas) que no están presentes en las masas no congeladas. Estas piezas de masa podrían ser parte de la red proteica que fue escindida por la acción mecánica de los cristales. De la misma forma, los gránulos de almidón presentaron daño en su superficie (Figura 2.12d). Estos resultados son similares a los obtenidos por Berglund et al (1991), quienes observaron que las masas almacenadas en estado congelado y las masas sujetas a ciclos de congelación - descongelación presentaron cambios en la distribución de agua y una matriz de gluten menos continua, más cortada y más separada de los gránulos de almidón.

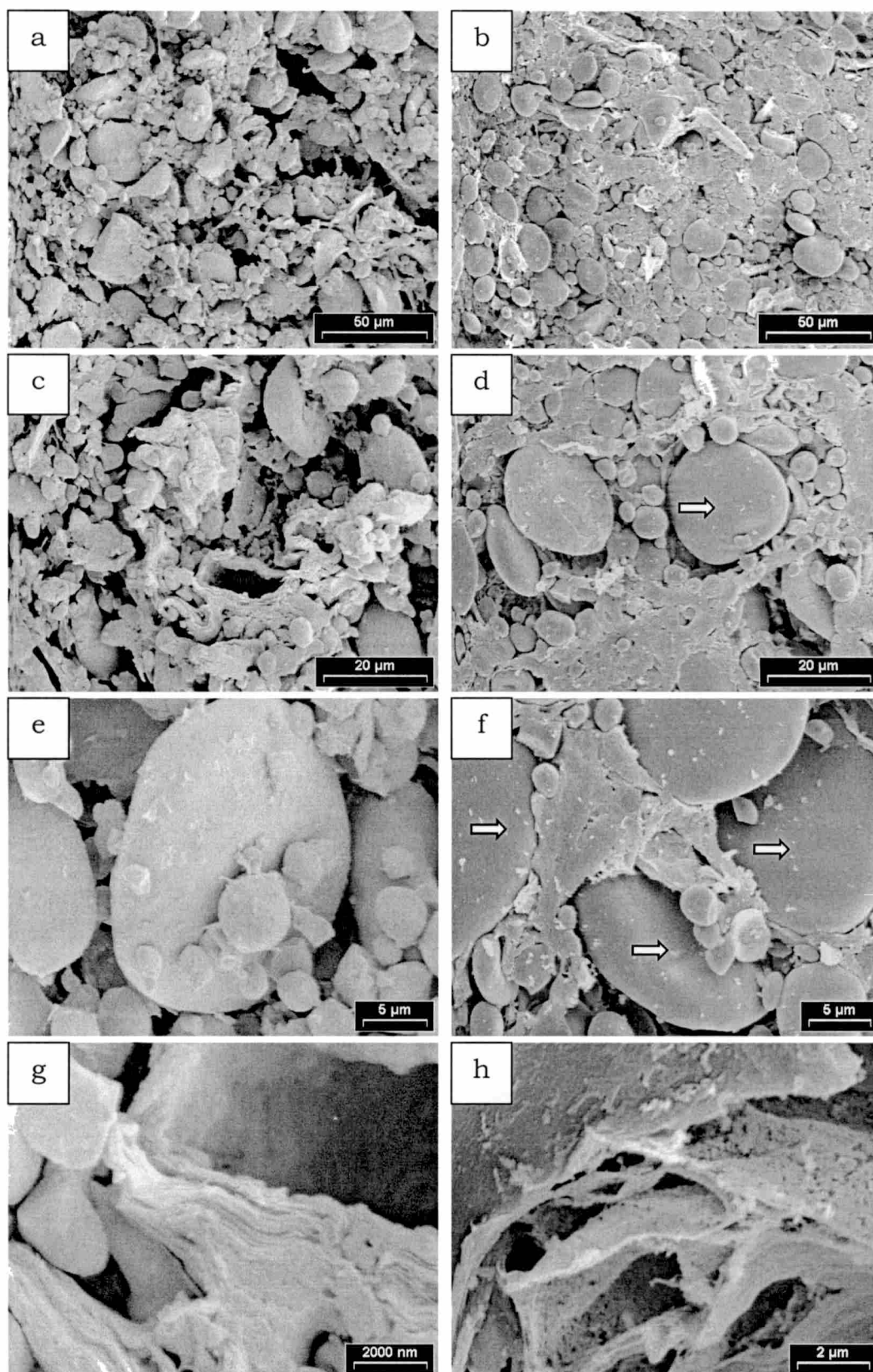


Figura 2.12. Microfotografías de masa no congelada (a, c, e, g) y congelada por 60 días (b, d, f, h). Aumentos: 600x (a, b), 1500x (c, d), 3600x (e, f) y 10000x (g y h). P: red proteica, A: gránulos de almidón.

Correlación entre la calidad del pan y la viscoelasticidad de las masas

El análisis de correlación entre el volumen de pan, tiempo de fermentación, relación de forma A/D, área de alvéolo, G^* y G' (Tabla 2.3) mostró la alta asociación que existe entre los parámetros representativos de la calidad de los panes y los característicos de la estructura de la masa. La caída en el volumen de pan y el aumento del tiempo de fermentación están relacionados con la pérdida de la resistencia total de la masa (G^*) y de la elasticidad (G'), ya que el debilitamiento de la estructura provoca una disminución en la capacidad de retención de gas en la masa, y consecuentemente un aumento del tiempo de fermentación (Kline y Sughiara 1968, Hsu et al 1979a).

La pérdida en la elasticidad de la masa, que se hace evidente por la disminución del módulo elástico, explica la caída en la relación A/D de los panes.

Según Bloksma (1985) la magnitud de la expansión, el espesor y la homogeneidad de la miga de pan es afectada por la fuerza de ruptura de la película de masa entre las celdas de gas. Basándose en esto, se puede sostener que el debilitamiento de la estructura de la red de gluten durante la congelación de la masa provocó un debilitamiento en la película de masa e hizo que cediera más fácilmente durante la fermentación y el posterior horneado. Esto produciría un aumento en el área relativa de alvéolos y una falta de uniformidad de las celdas de gas en la miga de los panes.

Tabla 2.3. Análisis de correlación (Pearson) entre los parámetros medidos.

	Volumen de pan	Tiempo de fermentación	A/D	Área de alvéolo	G* ¹	G' ¹
Volumen de pan	1,000	-0,999	-0,888	-0,993	0,757	0,994
Tiempo de fermentación		1,000	0,905	0,995	-0,762	-0,995
A/D			1,000	0,886	-0,583	-0,920
Área de alvéolo				1,000	-0,824	-0,980
G* ¹					1,000	0,694
G' ¹						1,000

¹ Masa sin fermentación previa al ensayo de viscoelasticidad.

La congelación de la masa a -18°C produjo una disminución de la calidad de pan reflejada en un menor volumen de hogaza, un mayor tiempo de fermentación, una estructura de miga más abierta, es decir con mayor proporción de alvéolos y menos homogénea. Conjuntamente, la forma y el color de la hogaza no fueron uniformes.

El análisis de los parámetros viscoelásticos permitió detectar una caída en la resistencia y en la elasticidad de la masa como consecuencia de la congelación. Por otra parte la microscopía electrónica de barrido mostró el daño estructural causado por la congelación de la masa.

Además, la firmeza de los panes aumentó con el tiempo de almacenamiento del pan, aunque no se encontraron diferencias significativas entre la firmeza de los panes obtenidos a partir de masas congeladas y no congeladas.

TERCERA SECCIÓN

EFECTO DE LA CONGELACIÓN DE LA MASA SOBRE LAS TRANSFORMACIONES PRODUCIDAS EN LAS PROTEÍNAS, EL ALMIDÓN Y LAS LEVADURAS

Proteínas

Efecto de la congelación de la masa sobre las proteínas de la harina

Con el objeto de estudiar los cambios que sufren las proteínas de la harina por la congelación de la masa, se las extrajo a partir de masa no congelada y congelada por 2, 3 y 4 meses. Las distintas masas fueron liofilizadas y se las sometió al proceso de extracción de proteínas mencionado en Materiales y Métodos.

El perfil electroforético de las proteínas extraídas con SDS y con 2-mercaptoetanol (BME), el cual muestra los monómeros que constituyen las proteínas, no cambió con el tiempo de congelación de la masa. Esto indica que el proceso de congelación de la masa no provocó cambios en los enlaces peptídicos de las distintas especies polipeptídicas.

Por el contrario, los patrones electroforéticos de las proteínas extraídas sólo con SDS mostraron cambios en la zona correspondiente a agregados proteicos. La Figura 3.1 muestra los perfiles electroforéticos de los agregados proteicos solubles en buffer - SDS en condiciones no reductoras. El análisis densitométrico de estos perfiles fue difícil de efectuar debido al “chorreado” que producen las proteínas sin reducir, pero a simple vista se evidenció una atenuación de ciertas bandas (zona señalada por la flecha) de proteínas al aumentar el tiempo de almacenamiento de la masa en estado congelado.

Para determinar con más detalle los cambios que provoca en las proteínas la congelación de la masa, se las separó en condiciones no reductoras en tres fracciones basadas en su migración en geles con dos “stacking” y un gel separador (Figura 3.2) y seguidamente, se analizó la composición de estos agregados proteicos mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 3.3).

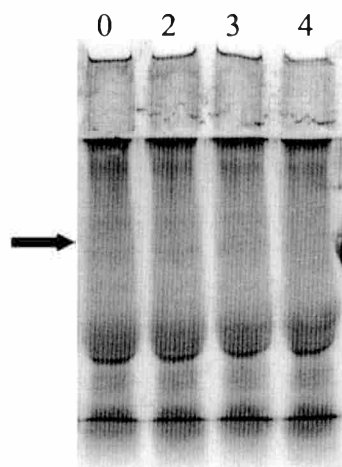


Figura 3.1. SDS-PAGE de los extractos de proteínas sin agente. Línea 0: masa no congelada, líneas 2, 3 y 4: masa congelada por 2, 3 y 4 meses respectivamente.

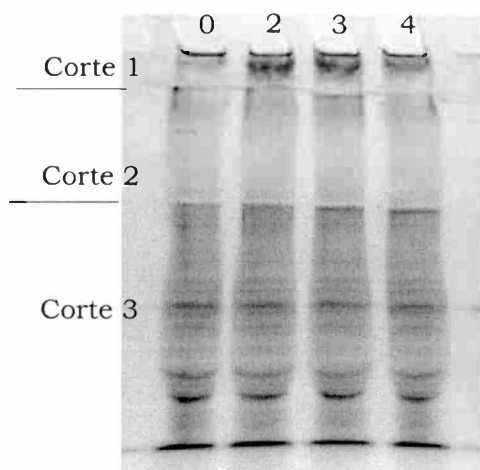


Figura 3.2. Patrones de los extractos de proteína sin agente reductor en SDS-PAGE con “multistacking”. Línea 0: masa no congelada, líneas 2, 3 y 4: masa congelada por 2, 3 y 4 meses respectivamente. Corte 1: gel de “stacking” (4 % de acrilamida). Corte 2: gel de “stacking” (8 % de acrilamida). Corte 3: gel de resolución (12 % de acrilamida).

La masa molecular de los agregados proteicos en los orígenes de los geles es difícil de estimar, pero el tamaño relativo de estas moléculas puede ser comparado según su movilidad en los geles con “multistacking”, dado

que a medida que la concentración de gel de “stacking” se incrementa, el tamaño de poro del gel es más pequeño. Las proteínas retenidas en cada origen de gel representan aquellas cuyas masas moleculares son demasiado grandes para migrar al próximo gel, es decir, las proteínas alcanzaron el límite del tamaño de los poros del “stacking”. En consecuencia, los agregados proteicos retenidos en un “stacking” de 4 % son más grandes que los retenidos en el inicio del gel con 12 % de acrilamida.

Los perfiles proteicos en los geles con “multistacking” mostraron que se retenía una gran proporción de agregados proteicos de gran tamaño en el gel de “stacking” de 4 % de acrilamida, mientras que en el gel de 8 % la cantidad retenida fue mucho menor. En el inicio del gel de resolución, también quedó retenida una gran proporción de agregados proteicos.

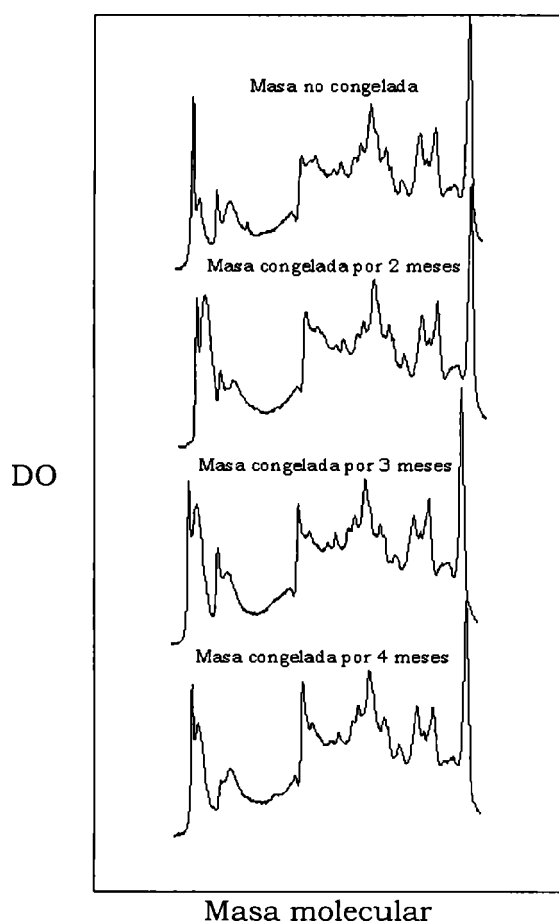


Figura 3.3. Densitometría de las electroforesis con “multistacking” de las proteínas extraídas en condiciones no reductoras.

El análisis densitométrico (Figura 3.3) de las bandas correspondientes a los perfiles de las masas no congelada y almacenadas en estado congelado por distintos tiempos no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$). Inoue et al (1994) tampoco encontraron diferencias entre los perfiles electroforéticos de proteínas solubles en ácido acético no reducidas de masas congeladas por 1, 7 y 70 días.

Seguidamente, se realizaron geles preparativos (1,5 mm de espesor) con cada muestra (masa no congelada y masa congelada por 2, 3 y 4 meses) y se separaron los geles en tres cortes. El corte 1 corresponde al “stacking” con 4 % de acrilamida, el corte 2 al “stacking” con 8 % de acrilamida, y el corte 3 al gel de resolución con 12 % de acrilamida. Los agregados fueron reducidos químicamente y eluidos a partir de los distintos cortes con el objetivo de analizar posibles cambios en su composición. En la Figura 3.4 se muestran los perfiles electroforéticos de los agregados proteicos reducidos. El análisis densitométrico de estos perfiles mostró diferencias entre las distintas muestras analizadas.

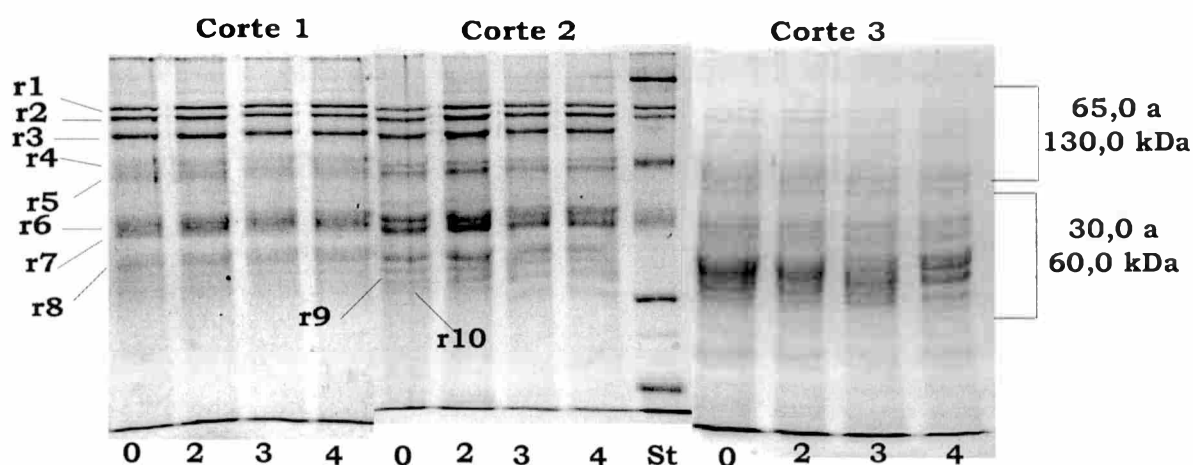


Figura 3.4. Patrones de los extractos de proteínas reducidas y extraídas de los geles en multistacking (cortes 1, 2 y 3). Línea 0: masa no congelada, líneas 2, 3 y 4: masa congelada por 2, 3 y 4 meses respectivamente. Línea St: marcadores de peso molecular. Flechas r1-r10: bandas proteicas analizadas por densitometría. En la parte derecha de la foto se detallan las regiones de masa molecular analizada.

Los perfiles de las proteínas obtenidas de los distintos cortes de los geles (corte 1; 2 y 3) en “multistacking” mostraron bandas proteicas, identificadas desde r1 a r10, de masa molecular $129,1 \pm 3,4$; $105,9 \pm 3,5$; $88,7 \pm 0,6$; $69,9 \pm 0,4$; $64,7 \pm 0,8$; $46,9 \pm 0,6$; $44,5 \pm 0,4$; $40,2 \pm 0,7$, $38,9 \pm 0,2$ y $36,7 \pm 0,3$ kDa respectivamente. Los perfiles electroforéticos obtenidos revelaron que los agregados retenidos en los cortes 1 y 2 estuvieron formados por una gran proporción de subunidades proteicas de masa molecular alta (r1-r3) y media (r4-r8). No se detectó la presencia de subunidades de masa molecular baja ($< 30,0$ kDa). Por el contrario, el corte 3, mostró un perfil electroforético constituido por una gran proporción de proteínas de masa molecular media y baja (LMW) (30,0-60,0 kDa), es decir proteínas (gliadinas, albúminas y globulinas) incapaces de formar parte de los grandes agregados proteicos retenidos en los cortes 1 y 2, y sólo se observaron vestigios de las bandas de masa molecular alta. Esto es coincidente con el hecho que sólo las subunidades de glutenina, son capaces de formar puentes disulfuro intermoleculares (además de intramoleculares), formando los agregados de gluteninas nativos (Wrigley et al 1998).

Los agregados proteicos retenidos en el corte 2 estaban formados por una mayor proporción de subunidades de gluteninas de masa molecular intermedia, mientras que aquellos retenidos en el corte 1 tuvieron una mayor proporción de subunidades de masa molecular alta (HMW). Esto significa que los agregados de más grandes estaban constituidos por una mayor proporción de subunidades HMW-gluteninas, que los agregados más pequeños retenidos en el gel de 8 % de acrilamida. Huang y Khan (1997), trabajando con proteínas de harina de trigo y con geles con cinco “stacking” (4 %, 6 %, 8 %, 10 % y 12 % de acrilamida) y un gel separador (14 % de acrilamida), encontraron que los agregados proteicos más grandes estaban integrados por mayor proporción de subunidades de HMW-gluteninas.

El análisis densitométrico de los patrones electroforéticos de las proteínas eluidas del corte 1 (Figura 3.5) mostró que con el aumento del tiempo de congelación de las masas disminuyó la cantidad de subunidades de HMW-gluteninas r1 (129,1 kDa), r2 (105,9 kDa), y r3 (88,7 kDa). Por otro

lado, aumentó la cantidad de subunidades de proteínas de masa molecular intermedia r5 (64,7 kDa), r6 (46,9 kDa) y r8 (40,2 kDa), y de péptidos que forman parte del frente de corrida. Estos cambios sugieren que la estructura proteica sufrió una depolimerización durante el almacenamiento de la masa en estado congelado, y que ésta fue mayor al aumentar el período de almacenamiento a -18°C , como mostró el alto grado de correlación entre la proporción de subunidades con el tiempo de almacenamiento de la masa en estado congelado (r_1 : -0,992; r_2 : -0,969; r_3 : -0,977, r_5 : 0,999; r_6 : 0,951; r_8 : 0,998 y frente de la corrida: 0,995). Este fenómeno podría causar pérdida de la capacidad de retención de gases durante la fermentación, explicando el menor volumen de los panes y el aumento de los tiempos de fermentación detectados.

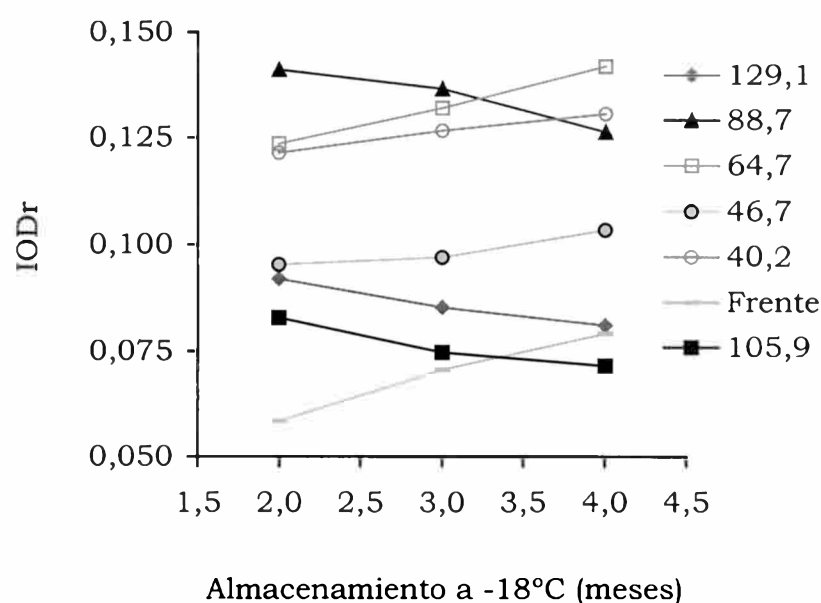


Figura 3.5. Efecto del tiempo de congelación de la masa sobre las proteínas obtenidas del corte 1 de los geles de “multistacking”. A la derecha de la Figura se detalla la masa molecular (kDa) de las bandas proteicas analizadas.

El análisis densitométrico de las proteínas reducidas del corte 2 (Figura 3.6) mostró que con el aumento del tiempo de almacenamiento de las masas a -18°C aumentó la cantidad de subunidades de gluteninas de masa molecular alta r1, r2, y r3, y de subunidades de proteínas de masa molecular media r4, r5, y r6 (69,9; 64,7; 46,9 kDa respectivamente). A su vez disminuyó la cantidad de ciertas subunidades de masa molecular baja r9 y r10 (38,9 y 36,7kDa respectivamente). Estos cambios en la proporción de subunidades de proteínas tuvieron un alto grado de correlación con el tiempo de almacenamiento (r1: 0,978; r2: 0,993; r3: 0,968; r4: 0,939; r5: 0,999; r6: 0,929; r9: -0,918 y r10: -0,912 respectivamente).

El aumento de la proporción de HMW-gluteninas con el tiempo de almacenamiento en estado congelado, pudo deberse a que la depolimerización sufrida por los grandes agregados de proteínas, retenidos en el “stacking” más concentrado, durante este período produjo agregados de menor tamaño que quedaron retenidos en el “stacking” de 8 %. Al reducirse, produjeron mayor cantidad de subunidades de HMW-gluteninas.

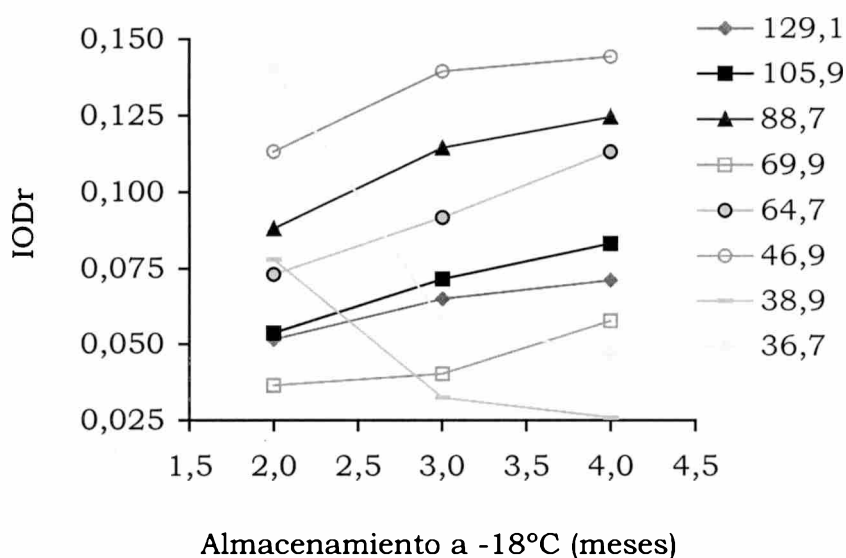


Figura 3.6. Efecto del tiempo de congelación de la masa sobre las proteínas obtenidas del corte 2 de los geles de “multistacking”. A la derecha de la Figura se detalla la masa molecular (kDa) de las bandas proteicas analizadas.

Las proteínas eluidas del gel separador mostraron una baja proporción de subunidades de HMW-gluteninas (65,0-130,0 kDa) y una gran proporción de proteínas de masa molecular comprendida entre 60,0-30,0 kDa. Este resultado indicó que la mayor parte de las proteínas de alta masa molecular (80,0-130,0 kDa) forma parte en la masa de grandes agregados. Las unidades de proteínas reducidas del gel separador (corte 3) no mostraron una tendencia clara como las subunidades mencionadas anteriormente.

Es aceptado comúnmente que las subunidades de gluteninas son capaces de establecer enlaces disulfuro intra e intermoleculares, pero no así las de gliadinas. Esta diferencia permite la formación de macropolímeros de gluteninas (GMP), que juegan un rol especial en el mantenimiento de la estructura del gluten. Diferentes estudios mostraron que los GMP están compuestos por agregados débiles de subunidades de gluteninas que pueden romperse durante el amasado, liberando oligómeros y dímeros de composición definida. Algunas LMW- (especialmente tipo B) y HMW-gluteninas pueden ser depolimerizadas si las masas son amasadas en forma excesiva (Weegels et al 1996, Weegels et al 1997, Lindsay y Skerit 1999). La estructura del gluten en masas congeladas también puede ser afectada por una redistribución de agua, una recristalización del hielo y un incremento de la cantidad de agua capaz de congelarse. Estos factores, además de las sustancias que liberan las células de levaduras durante su congelación, pueden ser algunas de las razones por las que se produce la depolimerización de los agregados proteicos observada en este trabajo. La depolimerización produjo especies proteicas de masa molecular (40,0-65,0 kDa) similar a las gluteninas rotas por el amasado (LMW) en los trabajos citados previamente.

La ruptura de los polímeros de proteínas podría ser una de las causas de la pérdida de calidad de los panes obtenidos de masas congeladas ya que la fuerza de la red polimérica se atribuye a la concentración y fuerza de los enlaces entre las cadenas, la masa molecular de las regiones que interactúan, la masa molecular promedio y la distribución de masas moleculares de los polímeros constituyentes (Bushuk y MacRitchie 1987).



Además, los atributos relacionados con la fuerza de la masa aumentan con un incremento de la proporción de polímeros proteicos de mayor tamaño (Wrigley et al 1998).

Se estudió también la influencia del proceso de congelación de la masa sobre las proteínas de la harina mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). Los extractos proteicos de masas no congeladas y congeladas y mantenidas a -18°C por 2, 3 y 4 meses fueron inyectados en la columna cromatográfica. En la Figura 3.7 se muestran los perfiles característicos de las proteínas de trigo solubles. La cromatografía de este tipo separa las proteínas según su masa molecular. Las proteínas solubles en buffer fosfato con 2% de SDS fueron fraccionadas por SEC en 5 picos principales en orden decreciente de tamaño, que eluyeron a 8,36; 11,74; 13,50; 14,62 y 19,30 mL respectivamente. Las masas moleculares estimadas por comparación con los marcadores utilizados fueron $1237,0 \pm 17,0$; $259,6 \pm 8,5$; $115,3 \pm 4,5$; $68,8 \pm 4,4$ y $7,9 \pm 0,4$ kDa respectivamente (los valores son aproximados debido a que la solución de extracción y el buffer de elución contenían SDS mientras que la solución de estándares se preparó y eluyó sin este detergente). Graveland et al (1985) obtuvieron resultados similares trabajando con una columna Sepharose CL-4B. La fracción de gluteninas solubles en SDS (insolubles en etanol al 70 %) fue separada en dos picos principales, con una masa molecular aproximada de varios millones y de $8,0 \times 10^5$ respectivamente. El segundo pico mostró un hombro con proteínas de masa molecular estimada en $6,0 \times 10^5$. La caracterización de las subunidades que formaron estos picos mostró que incluían principalmente las subunidades de gluteninas A, B y C y una pequeña cantidad de gliadinas.

Singh et al (1990), utilizando un cromatógrafo líquido de alto rendimiento y condiciones similares de ensayo a las de este trabajo, pero una columna cromatográfica para proteínas con masas moleculares de 10,0 a 500,0 kDa, fraccionaron los extractos proteicos en tres picos según disminuyó el tamaño molecular, y estimaron las masas moleculares en $>100,0$; 25,0-80,0 y 5,0-25,0 kDa respectivamente. Estas fracciones

representaron principalmente gluteninas, gliadinas y albúminas-globulinas respectivamente. Por otro lado, Ciaffi et al (1996), en condiciones semejantes a las anteriores, también separaron las proteínas solubles en tres picos y determinaron su composición mediante SDS-PAGE. El pico de mayor masa molecular estaba formado por grandes agregados cuyos monómeros fueron péptidos de masa molecular alta y baja. Los dos picos restantes estaban constituidos por proteínas monoméricas. El segundo incluyó mayormente gliadinas con masa molecular alta (tipos ω y γ), y el tercero gliadinas con menor masa molecular (tipos α y β) y albúminas y globulinas.

Los resultados expuestos de otros autores y las masas moleculares aproximadas encontradas en este trabajo nos permite inferir que los picos 1 y 2 están formados por agregados proteicos de muy alta masa molecular, mientras que los picos 3 a 5 por monómeros de masa molecular alta a baja, respectivamente.

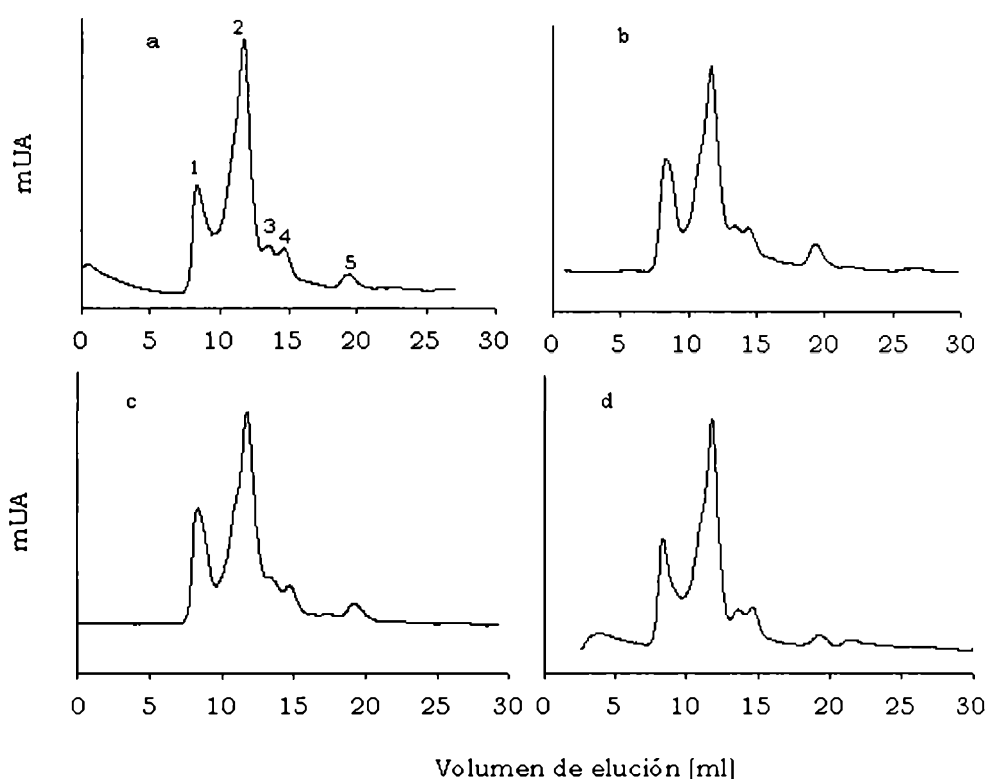


Figura 3.7. Perfiles cromatográficos de los extractos de proteínas sin agente reductor. a: masa no congelada; b, c y d: masa congelada por 2, 3 y 4 meses respectivamente. Velocidad de flujo 0,5 mL/min.

El área relativa de los picos (Tabla 3.1) no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos diagramas correspondientes a masa no congelada y almacenada en estado congelado por 2, 3 y 4 meses.

Tabla 3.1. Análisis de las áreas de pico correspondientes a los perfiles cromatográficos (Figura 3.7) de masa no congelada y almacenada en estado congelado por 2, 3 y 4 meses.

Picos	Área relativa al área total del cromatograma (%)			
	No congelada	Tiempo de almacenamiento (meses)		
		2	3	4
1	21,8	24,5	24,6	23,3
2	64,8	57,1	60,4	64,9
3	6,0	6,9	6,9	5,5
4	5,0	7,3	5,4	5,4
5	2,5	4,1	2,8	1,0

Posteriormente, se llevó a cabo el fraccionamiento por SEC a menor velocidad de flujo con el fin de lograr una mejor separación. En la Figura 3.8 se muestran los perfiles correspondiente a masa congelada por 2 meses (b) y no congelada (a). Los perfiles obtenidos se modificaron al variar la velocidad de separación. En este último caso se encontraron 5 picos, tres de los cuales se solapaban (2, 3 y 4). Las fracciones proteicas correspondientes a los picos 2-5 eluyeron más tarde en la masa congelada por 60 días. Los volúmenes de elución y las masas moleculares de cada pico se muestran en la Tabla 3.2.

El análisis de las áreas de pico mostró que el área del pico 1 disminuyó de 10,9 a 6,3 % mientras que aumentó la de los picos 2 (13,4 a 15,0 %) y 3 (48,8 a 50,2 %) luego de dos meses de almacenamiento en estado congelado. Estos resultados pueden explicarse por la ruptura de los grandes

agregados proteicos en agregados de menor tamaño provocada por el proceso de congelación de la masa, y es coincidente con los resultados encontrados en el estudio realizado mediante electroforesis previamente discutidos.

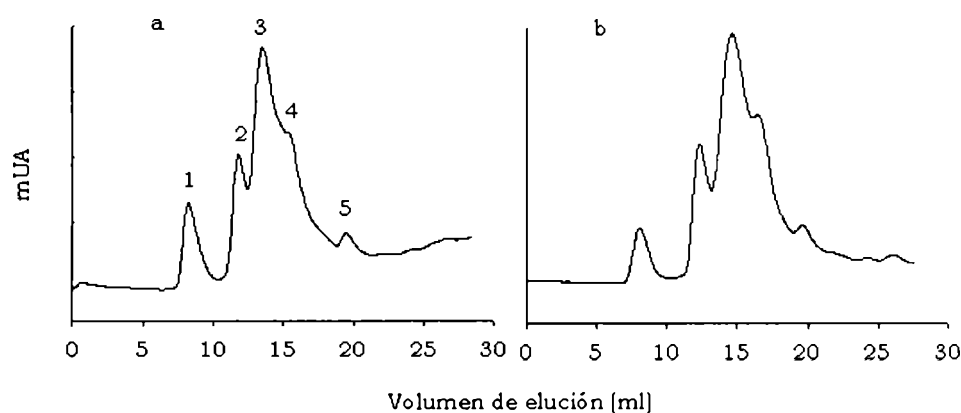


Figura 3.8. Perfiles cromatográficos de los extractos de proteínas sin agente reductor. **a:** masa no congelada; **b:** masa congelada por 2 meses. Velocidad de flujo 0,25 mL/min.

Tabla 3.2. Volúmen de elución y masa molecular de las fracciones proteicas separadas por SEC (Figura 3.8) de masa no congelada y mantenida por 2 meses a -18°C .

Picos	Masa no congelada		Masa congelada por 60 días	
	Volumen de elución (ml)	Masa molecular (kDa)	Volumen de elución (ml)	Masa molecular (kDa)
1	8,18	1344,0	8,06	1420,0
2	11,75	259,0	12,29	202,0
3	13,45	118,0	14,66	68,0
4	15,50	45,8	16,56	28,1
5	19,43	7,5	19,57	7,0

Almidón

Efecto del cloruro de sodio y la levadura prensada sobre el proceso de gelatinización del almidón

La gelatinización del almidón puede ser definida como el colapso del orden molecular dentro del gránulo por el efecto del agua y el aumento de la temperatura, que se manifiesta en cambios irreversibles de las propiedades del almidón como el hinchamiento del gránulo, la fusión de los cristalitos nativos, la pérdida de la birrefringencia y la solubilización del almidón.

En la Figura 3.9 se muestra el perfil térmico obtenido por DSC de masa panaria. La curva muestra dos endotermas que se superponen, la primera corresponde a la gelatinización del almidón (G o M1), y la segunda a la energía requerida para fundir la estructura semicristalina más estable (F o M2) resultante del bajo nivel de agua de la muestra. La endoterma correspondiente a la disociación del complejo amilosa - lípido (M3) no fue detectada debido a que el programa de calentamiento elegido no alcanzó la temperatura necesaria para completar esta transformación y se produjo un cambio en la línea de base del termograma que ocultó el comienzo de la endoterma, como resultado de la variación de la velocidad de calentamiento de la muestra. Los termogramas obtenidos fueron similares a los mostrados en trabajos previos empleando el mismo diseño experimental para masas no congeladas fermentadas y no fermentadas (León et al 1997a) y para mezclas de harina - agua con contenidos similares de agua a la formulación usada en este estudio (Jovanovich et al 1992).

El proceso de gelatinización puede ser afectado por la adición de otros ingredientes, por el agregado de almidones con diferente relación amilosa - amilopectina, por modificación química del almidón, por tratamientos térmicos previos del almidón (por ejemplo “annealing”), por la cantidad de agua del sistema, etc.

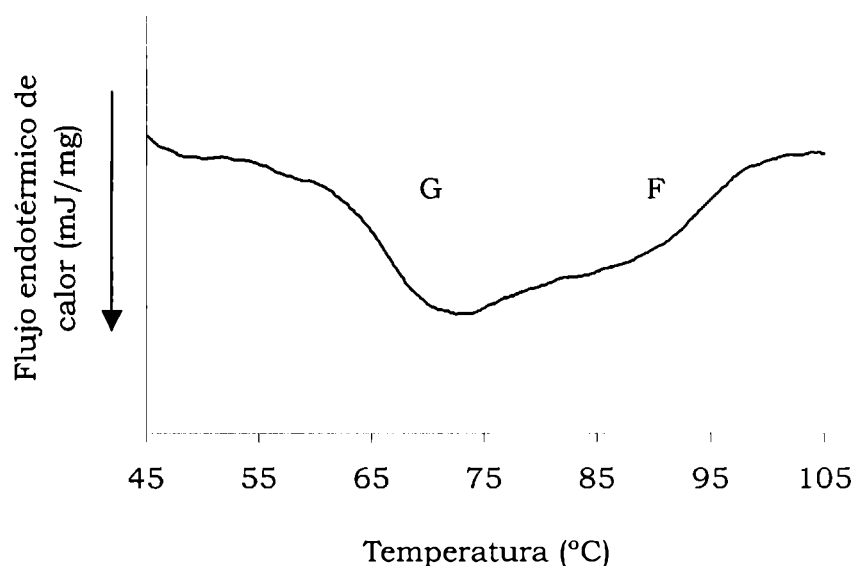


Figura 3.9. Termograma de masa de pan. Los picos solapados corresponden a la gelatinización (G) y a la fusión de las zonas cristalinas más estables del almidón (F).

En el presente trabajo se estudió la influencia de la adición de sal (NaCl) y de las levaduras sobre la gelatinización del almidón imitando el proceso de cocción de la masa en el horno. Se prepararon distintas mezclas de almidón - agua con cloruro de sodio y levadura, en las proporciones que se encuentran en la masa de pan y se calentaron en el calorímetro a temperaturas similares a las medidas en el centro de la miga durante la etapa de horneado. Las curvas obtenidas fueron semejantes a la expuesta en la Figura 3.9. El análisis de las endotermas mostró que las mezclas que contenían NaCl y/o levadura experimentaron un incremento significativo ($p < 0,05$) en la temperatura de inicio, “onset”, de gelatinización (T_o) del almidón con respecto a la mezcla de harina agua (Tabla 3.3). La sal disminuye la actividad de agua del sistema (Donovan 1977, Ghiasi et al 1983, Chinachoti et al 1991), pero no se conoce el efecto de las levaduras en este proceso.

Tabla 3.3. Efectos de la congelación de la masa sobre la temperatura de onset (T_o), el rango de temperatura de gelatinización (ΔT_g) y la entalpía de gelatinización del almidón (ΔH_g) de las diferentes mezclas.

Mezcla	T_o (°C)	T_p (°C)	ΔH_g (mJ/mg)
Harina:agua (100:64)	57,7±0,1a	44,5±1,0p	3,34±0,11tv
Harina:agua:levadura (100:64:3)	60,2±0,2b	42,2±0,1p	2,82±0,42t
Harina:agua:NaCl (100:64:1,8)	60,3±0,3b	44,2±0,4p	3,68±0,20tv
Harina:agua:NaCl:levadura (100:64:1,8:3)	59,7±0,3b	44,1±1,3p	3,92±0,13v

Efecto de la congelación de la masa sobre la gelatinización y la retrogradación del almidón

El proceso de gelatinización es afectado por el daño mecánico y la historia térmica de la muestra. Para estudiar la influencia del proceso de congelación de la masa sobre la gelatinización del almidón se colocó masa en las cápsulas y se congeló. Después de 1, 60, 150 y 230 días de almacenamiento las masas se descongelaron y fermentaron por 2 horas a 30°C. Posteriormente, se sometieron en el DSC al programa de calentamiento descrito anteriormente, con el objetivo de hornear la masa en la cápsula. Este programa de calentamiento imita el proceso de horneado.

La Tabla 3.4 muestra la influencia de la congelación de la masa sobre la gelatinización del almidón durante el horneado de la masa en el calorímetro. La T_o disminuyó significativamente ($p<0.05$) como consecuencia del almacenamiento de la masa a -18°C. Estos resultados fueron similares a los informados por Autio y Sinda (1992), quienes encontraron diferencias en la T_o de masas congeladas y no congeladas. El ΔT_g no cambió significativamente ($p<0,05$) durante el almacenamiento a temperaturas bajo cero.

Con respecto a la entalpía involucrada en la gelatinización y la fusión de los cristales de almidón, los resultados obtenidos mostraron que la congelación de la masa produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) de la entalpía luego de 230 días de almacenamiento a -18°C . Lu y Grant (1999) también encontraron que el ΔH de gelatinización del almidón aislado de masa aumentó después de 16 semanas de almacenamiento de la masa en estado congelado, en todos los cultivares en estudio.

Tabla 3.4. Efecto de la congelación de masa sobre la temperatura de onset (T_o), el rango de temperatura de gelatinización (ΔT_g) y la entalpía de gelatinización del almidón (ΔH_g).

Tiempo de almacenamiento a -18°C (días)	T_o ($^{\circ}\text{C}$)	ΔT_g ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_g (mJ/mg)
0	$61,7 \pm 0,1$ c	$41,4 \pm 0,1$ pq	$3,75 \pm 0,01$ tv
1 ¹	$60,6 \pm 0,1$ bc	$40,5 \pm 0,3$ p	$3,60 \pm 0,07$ t
60	$60,4 \pm 0,5$ b	$38,8 \pm 0,2$ p	$3,72 \pm 0,09$ tv
150	$60,4 \pm 0,1$ b	$39,4 \pm 1,7$ p	$3,90 \pm 0,01$ v
230	$57,8 \pm 0,1$ a	$43,7 \pm 0,1$ q	$4,11 \pm 0,10$ x

¹ Tiempo necesario para que el centro de la masa alcance -18°C .

Cuando a una pasta de almidón (gránulos de almidón calentados con suficiente agua y a una temperatura tal que gelatinicen y se solubilicen parte de las moléculas) se le permite enfriar, se forma un gel. Con el tiempo, las moléculas de almidón pueden reasociarse y desarrollar una estructura cristalina. Al mismo tiempo se produce un incremento en la rigidez de la matriz, y una separación del solvente del polímero. Este fenómeno es conocido como retrogradación.

Para estudiar la influencia de la congelación de la masa sobre el proceso de retrogradación del almidón, la masa se colocó en las cápsulas, se cerraron herméticamente, se congelaron por distintos períodos de tiempo y se hornearon en el DSC. Posteriormente, se almacenó a 20°C por 7 días para analizar la retrogradación de la amilopectina. Las masas envejecidas fueron sometidas a un segundo calentamiento en el calorímetro. Los termogramas obtenidos muestran dos endotermas bien definidas correspondientes a la fusión de los cristales formados durante el envejecimiento y representativa de la retrogradación de amilopectina (R) y a la fusión del complejo amilosa - lípido (C) (Biliaderis 1990) (Figura 3.10).

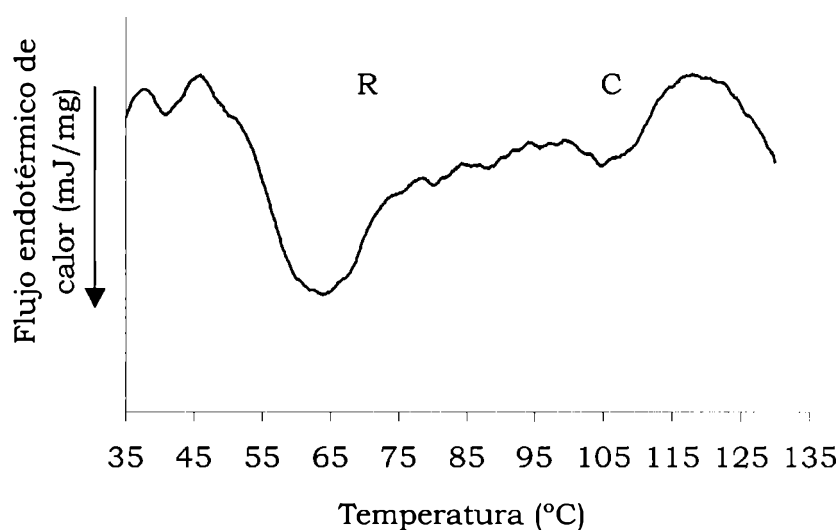


Figura 3.10. Termograma de masa previamente horneada en el calorímetro, y almacenada a 20°C por 7 días. R: pico correspondiente a la retrogradación de amilopectina. C: pico correspondiente a la fusión del complejo amilosa - lípido.

La Tabla 3.5 muestra el efecto de la congelación de la masa sobre el proceso de retrogradación de la amilopectina. Los resultados obtenidos indican que mientras mayor es el tiempo que la masa es mantenida a -18°C, más extensa es la retrogradación de la amilopectina ($p < 0,05$). La misma tendencia fue observada previamente en masa congelada por 1 mes a -18°C y envejecida a temperatura ambiente (León et al 1997a). Por otro lado, la To

disminuyó en forma significativa ($p < 0,05$) después de 150 días de almacenamiento a -18°C con respecto a la masa congelada y almacenada por 1 y 60 días, pero no se observaron diferencias con la masa no congelada. El rango de gelatinización, ΔT_g , no mostró cambios significativos por el proceso de congelación de la masa.

Generalmente se acepta que la retrogradación del almidón, medida por DSC, es afectada por diferentes factores, tales como el contenido de agua, de lípidos y otros ingredientes (Biliaderis 1990). Zeleznak y Hoseney (1986) mostraron que la entalpía de retrogradación en geles de almidón (con un 50 % de agua) y en panes (con un 30 a 40 % de agua) depende del contenido de agua de la muestra durante el almacenamiento. La magnitud del pico de fusión de la amilopectina fue controlada por la disponibilidad de agua durante el proceso de retrogradación, mientras que el contenido de agua durante la gelatinización tuvo poco efecto. Lu y Grant (1999) informaron que la cantidad de agua no-congelable (medida por DSC) en masas congeladas aumentó con el tiempo de almacenamiento a temperaturas bajo cero.

Los resultados obtenidos en este trabajo, coincidentemente con los de Berglund et al (1991), indican que durante el almacenamiento de la masa en estado congelado existe una redistribución del agua total presente en el sistema. Probablemente también se produzca, durante el almacenamiento, una recrystalización de los cristales de hielo lo que lleva a la formación de un número menor de cristales pero de mayor tamaño. Estos procesos (dislocación de agua y recrystalización del hielo) podrían inducir cambios en la estructura y la disposición de la amilosa y la amilopectina, y afectar la estructura del gluten. De acuerdo a los resultados encontrados en este estudio, tales cambios podrían reflejarse durante la gelatinización y la retrogradación del almidón.

La entalpía de fusión del complejo amilosa - lípido disminuyó con el incremento del tiempo de almacenamiento de la masa a -18°C , pero este cambio fue difícil de cuantificar debido a la forma no gaussiana de estas endotermas.

Tabla 3.5. Efectos de la congelación de masa sobre la temperatura de onset (T_o), el rango de temperatura de retrogradación (ΔT_g) y la entalpía de retrogradación de la amilopectina (ΔH_g).

Tiempo de almacenamiento a -18°C (días)	T_o ($^{\circ}\text{C}$)	ΔT_r ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_r (mJ/mg)
0	$48,0 \pm 1,2$ a	$30,2 \pm 0,7$ pq	$1,25 \pm 0,02$ v
1 ¹	$50,9 \pm 0,9$ b	$25,3 \pm 2,8$ p	$0,79 \pm 0,01$ t
60	$52,1 \pm 0,6$ b	$26,2 \pm 0,0$ pq	$0,88 \pm 0,05$ t
150	$46,8 \pm 0,3$ a	$30,5 \pm 1,7$ pq	$1,53 \pm 0,11$ x
230	$45,7 \pm 0,2$ a	$31,3 \pm 0,5$ q	$2,53 \pm 0,03$ y

¹ Tiempo necesario para que el centro de la masa alcance -18°C .

Efecto del envejecimiento del pan sobre la cinética de retrogradación de la amilopectina

Los termogramas obtenidos de masas congeladas, horneadas en el calorímetro y envejecidas a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a $3 \pm 1^{\circ}\text{C}$ mostraron las endotermas típicas correspondientes a la retrogradación de la amilopectina y a la fusión del complejo amilosa - lípido. Las muestras envejecidas por 1,5 h sólo exhibieron una endoterma, la que se puede asignar a la fusión del complejo amilosa - lípido.

Las Tablas 3.6a y 3.6b presentan los valores calculados de la temperatura de inicio, T_o , el rango de temperatura de retrogradación, ΔT_r , y la entalpía de retrogradación, ΔH_r , de la amilopectina para todas las muestras de pan (masa horneada en el DSC).

Tabla 3.6a. Efectos de la congelación de la masa y el tiempo de envejecimiento a 3°C sobre la temperatura de inicio, T_o , el rango de temperatura de retrogradación, ΔT_g y la entalpía de retrogradación de la amilopectina, ΔH_r .

	Tiempo de envejecimiento (días)	T_o (°C)	ΔT_r (°C)	ΔH_r (mJ/mg)
Masa no congelada Pan envejecido a 3°C	1	40,7±0,4ef	32,0±0,3klm	1,13±0,06s
	2	39,9±2,0de	34,3±5,5lmn	1,76±0,59tu
	4	38,5±0,1cd	36,5±1,5mnop	2,32±0,6vw
	6	37,3±1,7bc	39,7±5,9pq	2,6±0,59wx
	7	38,1±0,9cd	34,9±2,0lmno	3,29±0,23yz
Masa almacenada a -18°C Pan envejecido a 3°C	1	35,7±1,6ab	41,7±0,8q	2,10±0,12uv
	2	35,4±0,2a	39,3±1,1opq	2,89±0,07xy
	4	35,5±0,0ab	39,2±0,4opq	3,44±0,07z
	6	34,9±0,4a	38,5±0,0nopq	3,46±0,04z
	7	34,7±0,4a	38,8±0,8nopq	3,68±0,03z

La T_o fue más baja ($p<0,05$) en panes envejecidos a 3°C obtenidos de masas congeladas por 2 meses que en panes preparados con masas no congeladas. Mientras que a 20°C no se encontraron diferencias. Además, los panes envejecidos a 3°C, ya sean obtenidos a partir de masa congelada o no congelada, mostraron una T_o menor y un ΔT_r mayor que los panes envejecidos a 20°C, excepto en el primer día de envejecimiento a 3°C donde los panes obtenidos de masa no congelada presentaron un menor valor de ΔT_r .

Tabla 3.6b. Efectos de la congelación de masa y el tiempo de envejecimiento a 20°C sobre la temperatura de onset (T_o), el rango de temperatura de retrogradación (ΔT_g) y la entalpía de retrogradación de la amilopectina (ΔH_r).

	Tiempo de envejecimiento (días)	T_o (°C)	ΔT_r (°C)	ΔH_r (mJ/mg)
Masa no congelada Pan envejecido a 20°C	1	46,7±0,4g	32,9±2,7klm	0,94±0,09s
	2	46,1±0,6g	29,2±1,1k	1,30±0,06st
	4	46,2±0,9g	32,2±2,9klm	1,82±0,15tuv
	6	45,7±0,3g	32,2±0,9klm	2,03±0,09uv
	7	45,8±0,6g	31,8±2,2kl	2,18±0,06uvw
Masa almacenada a -18°C Pan envejecido a 20°C	1	42,2±1,4f	34,2±0,7lmn	1,11±0,19s
	2	45,9±0,86g	29,3±1,5k	1,32±0,18st
	4	46,5±0,5g	28,7±0,6k	1,92±0,07uv
	6	46,9±0,0g	29,4±0,0k	2,19±0,10uvw
	7	45,8±0,7g	29,5±1,6k	2,16±0,21uvw

La entalpía de retrogradación de las masas previamente horneadas en el calorímetro diferencial de barrido aumentó significativamente ($p < 0,05$) con el tiempo de envejecimiento. Los cambios en la entalpía fueron siempre mayores ($p < 0,05$) en panes almacenados, más de un día, a 3°C que a 20°C para muestras elaboradas a partir de masa congelada y no congelada. Estos resultados coinciden con los publicados por Cauvain (1998) y Biliaderis (1990). Este último autor demostró que la retrogradación del almidón es mayor mientras menor es la temperatura de envejecimiento, en un rango comprendido entre -1°C y 43°C.

Los panes obtenidos de masas almacenadas a -18°C por 60 días y

almacenados a 3°C presentaron un ΔH_r mayor que los elaborados con masa no congelada ($p < 0,05$).

La velocidad de retrogradación de la amilopectina en panes obtenidos de masa almacenada en estado congelado por 60 días fue más alta que la observada en panes obtenidos de masas no congeladas. Este fenómeno fue más evidente cuando el pan de envejeció a 3°C. El grado de retrogradación alcanzado por las masas horneadas en el DSC se incrementó cuando disminuyó la temperatura de envejecimiento de estas, tanto para muestras elaboradas con masa congelada como no congelada (Figura 3.11).

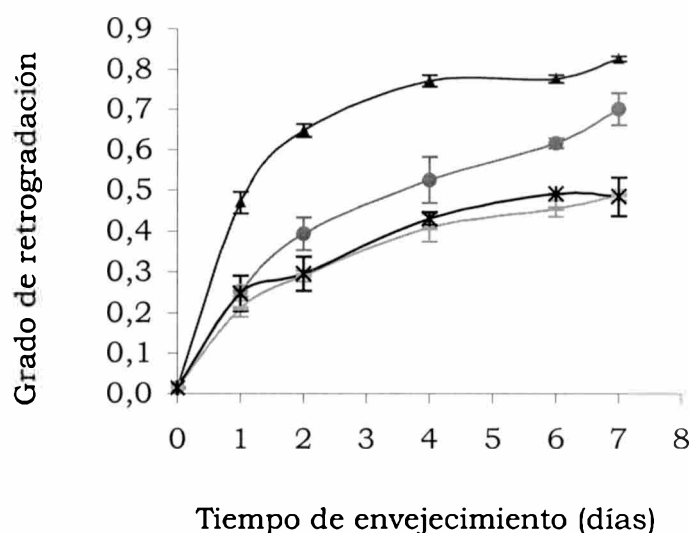


Figura 3.11. Efecto del proceso de congelación de la masa y el almacenamiento del pan obtenido en el DSC sobre el grado de retrogradación. Panes obtenidos desde masa sin congelar y envejecidos a 20°C (○) y a 3°C (●). Panes obtenidos de masa congelada por 60 días y envejecidos a 20°C (*-) y a 3°C (-▲-). Grado de retrogradación: $\Delta H_r / \Delta H_{\max}$, donde el ΔH_{\max} es el valor de la entalpía de gelatinización obtenida por DSC (programa de calentamiento 30°C a 130°C a 10°C/min) para una masa no congelada (control).

Estos resultados fueron independientes de los cambios en el contenido de humedad que puedan ocurrir en la muestra ya que se trabajó con

cápsulas herméticamente cerradas que evitan la pérdida de agua durante el ensayo.

Efecto del envejecimiento de pan sobre la cinética de retrogradación del almidón medida por difracción de rayos-X

La evidencia primaria del desarrollo de la cristalinidad en pan se obtiene por difracción de rayos-X. Esta técnica además de proveer información acerca de la estructura cristalina, puede dar una aproximación de la cantidad relativa de fases cristalinas y amorfas. Al examinar un difractograma de rayos-X de una sustancia parcialmente cristalina como el almidón, pueden encontrarse picos de absorción debidos al cristal y un “background” de la fase amorfa o gel. En almidones nativos la fase amorfa representa el 60-85 % del almidón total (Zobel 1988a, Zobel 1988b). En miga de pan esta fase se encuentra en una proporción más alta como se muestra en los difractogramas de rayos-X (Pisesookbunterng et al 1983). La fracción amorfa es importante en la retrogradación del almidón por ser la fuente de desarrollo del orden, por esto la prevención de su organización es benéfica para elaborar panes más blandos. En el almidón, la fusión de los cristalitos es precedida por una transición vítrea en el almidón amorfo. Esto es, en términos de estructura, un vidrio caracterizado por su temperatura de transición vítrea (T_g). T_g es la temperatura a la cual los polímeros comienzan a comportarse como una goma en lugar de un sólido firme o quebradizo. Cuando la temperatura aumenta, la fluidez del material incrementa. A temperaturas mayores que T_g las moléculas tienen una mayor movilidad, mientras que a temperaturas más bajas pierden movilidad. En consecuencia, la cristalización ocurre por encima de T_g , mientras que es retardada por debajo de esta temperatura.

Tal como se indicó anteriormente los gránulos de almidón nativo muestran diferentes diagramas de difracción de rayos-X dependiendo del origen botánico, el almidón de los cereales presenta un patrón tipo A. Cuando el almidón es calentado y dejado enfriar, como ocurre en la elaboración de pan, aparecen otras estructuras: la V que corresponde a la

formación del complejo amilosa - lípido (Zobel 1988a) y la B producida por la cristalización de almidón fundido amorfo (Knightly 1977, Zobel et al 1988).

El modelo aceptado para la conformación de las cadenas de almidón en las estructuras en las que forma complejos de inclusión propone hélices simples izquierdas. Las sustancias complejantes (alcoholes, ácidos grasos o surfactantes) pueden ubicarse en su interior, debido a la naturaleza hidrofóbica del interior de la hélice. El nivel de formación del complejo amilosa - lípido depende del tipo y cantidad de agente complejante, nivel de humedad y condiciones de calentamiento. La formación del complejo, evita que parte de la amilosa retrograde hacia la estructura tipo B, que contribuye a la firmeza de la miga (Zobel y Kulp 1996).

Las moléculas de almidón están entrelazadas como doble hélices derechas y paralelas en la estructura tipo B. Las doble hélices son estables debido a que las dos cadenas encajan en forma ajustada entre sí con las zonas hidrofóbicas de las unidades monoméricas opuestas en contacto cercano, y los grupos hidroxilos colocados de modo tal que existen puentes de hidrógeno intercatenarios. Las dobles hélices se conectan entre sí por una red de puentes de hidrógeno, que dejan un canal en el que se ubican en posiciones fijas las moléculas de agua, con la mitad de los puentes de hidrógeno interaccionando con la cadena de almidón y la otra mitad con el resto de las moléculas de agua (Jovanovich 1997).

Para estudiar la influencia de la congelación de la masa sobre el proceso de recristalización de las moléculas de almidón se analizó miga de pan en un difractómetro de rayos-X.

Las Figuras 3.12 y 3.13 muestran los difractogramas de rayos-X de pan fresco (miga almacenada por 2 h después del horneado) y envejecido por 1 y 7 días a 20°C y a 3°C, respectivamente. Una apreciación a simple vista de los difractogramas indica que la cristalinidad del almidón aumentó con el tiempo de almacenamiento de la miga y que la fase amorfa presentó una intensidad muy alta ("background" muy intenso). Además, se observó que los panes recién horneados mostraron sólo estructura cristalina tipo V representada por un pico a 19,9°, lo que indica la formación de un complejo

entre la amilosa y los ácidos grasos naturales que acompañan al almidón formando clatratos helicoidales. También se observó un pico pequeño característico de estructura tipo B a $17,1^\circ$. Con el envejecimiento, la estructura tipo B incrementó, mientras que la estructura tipo V pareció no sufrir cambios. Esto concuerda por lo publicado por Knightly (1977) y Zobel et al (1988).

Los difractogramas de panes elaborados con masa no congelada mostraron un “background” más alto que los obtenidos a partir masa congelada y almacenada a -18°C por 60 días.

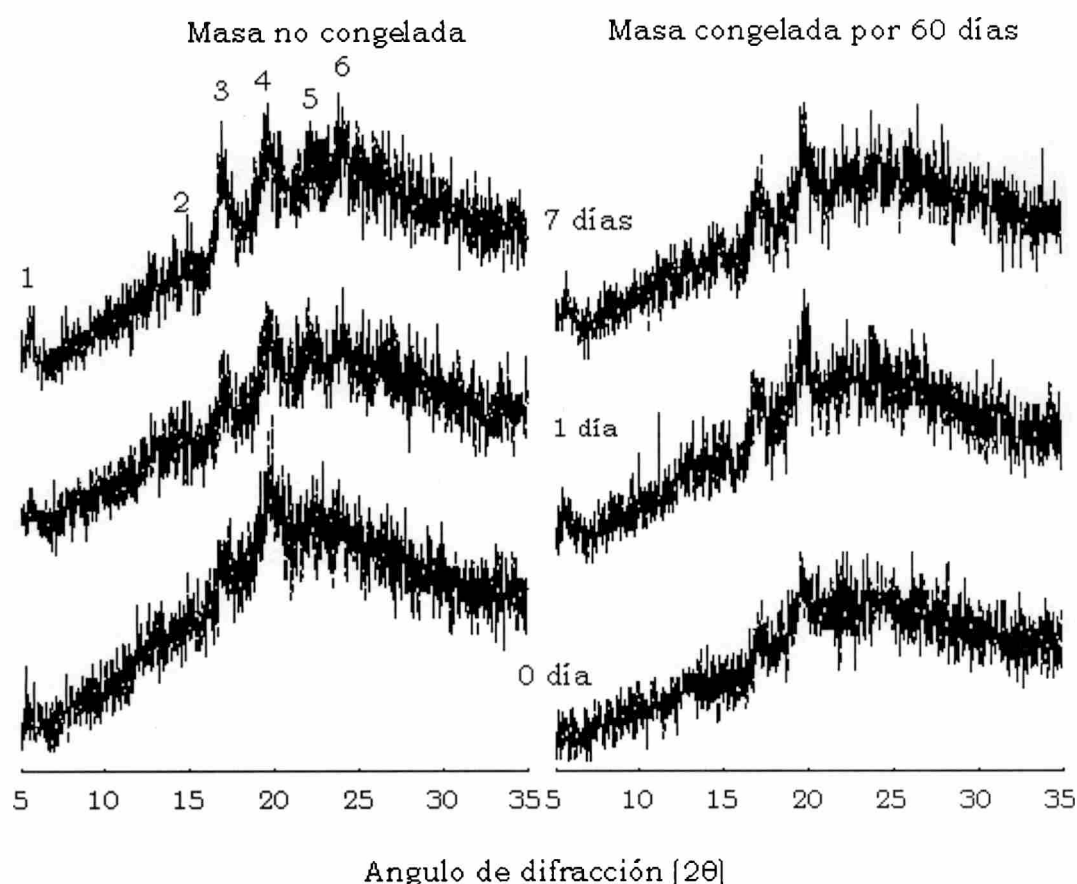


Figura 3.12. Patrones de difracción de rayos-X de miga de pan almacenada por 0, 1, 7 días a 20°C . Picos de difracción característicos de la estructura tipo B: 1, 2, 3, 5 y 6 ($15,7^\circ$; $5,9^\circ$; $5,2^\circ$; $4,0^\circ$ y $3,7^\circ$ respectivamente) y de estructura tipo V: 4 ($19,6^\circ$).

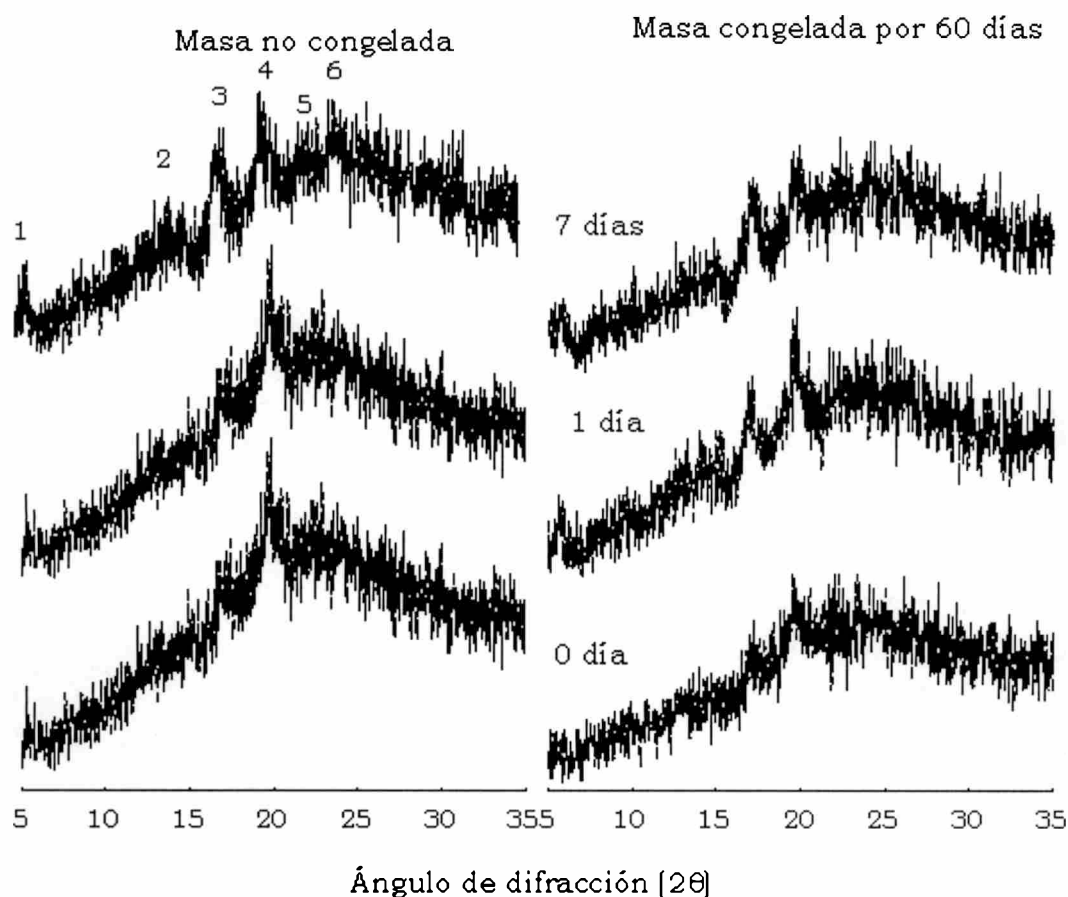


Figura 3.13. Patrones de difracción de rayos-X de miga de pan almacenada por 0, 1, 7 días a 3°C. Picos de difracción característicos de la estructura tipo B: 1, 2, 3, 5 y 6 (15,7; 5,9; 5,2; 4,0 y 3,7° respectivamente) y de estructura tipo V: 4 (19,6°).

El grado de cristalinidad total aumentó y la estructura tipo V varió muy poco durante el envejecimiento del pan, aunque ninguno de estos parámetros siguió una tendencia clara en este período. Esto podría revelar que la aparición de estructura tipo B se produce no sólo debido a la recristalización de almidón proveniente de la fase amorfa sino, también, por la transformación de otras estructuras cristalinas en estructura tipo B.

La identificación y cuantificación de las estructuras cristalinas presentes en los difractogramas se muestran en la Tabla 3.7. El análisis de

estos datos mostró que, en todos los casos, el grado de cristalinidad tipo B aumentó progresivamente durante el envejecimiento del pan.

El proceso de congelación de la masa no afectó significativamente la velocidad de recrystalización de la estructura tipo B, sólo los panes obtenidos a partir de masas congeladas y almacenados por 7 días a 20°C presentaron un grado de estructura tipo B más elevado que los elaborados con masa no congelada, mientras que los panes almacenados a 3°C presentaron un patrón de difracción similar. Existen algunas diferencias con los datos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido, debido a que la entalpía de retrogradación medida por esta técnica no sólo representa la fusión de la estructura tipo B, sino que debe ser interpretada como una suma de factores, tales como recrystalización de amilopectina, rehidratación y reordenamiento durante la fusión parcial del almidón. Por otro lado, se ha sugerido que la fase amorfa contribuye a los valores de ΔH (Biliaderis 1990). Sumado a estas diferencias, los difractogramas se realizaron sobre miga de pan descortezada y almacenada, mientras que en el DSC se simuló un horneado y se almacenaron las cápsulas con masa horneada, lo que puede provocar alguna diferencia en la humedad de las muestras analizadas.

Los panes obtenidos de masas no congeladas mostraron mayor grado de cristalinidad tipo V que los elaborados con masas congeladas. El grado de estructura V disminuyó con el envejecimiento de los panes provenientes de masas no congeladas y se mantuvo constante o aumentó muy poco en panes obtenidos a partir de masas congeladas. La falta de cambio en la estructura tipo V indudablemente contribuye a que la fracción de amilosa no sea el principal factor en el desarrollo de la firmeza de la miga con el envejecimiento (Zobel y Kulp 1996).

Por otro lado, el halo amorfo en los difractogramas obtenidos de pan fresco y envejecido, elaborado a partir de masa congelada presentó una intensidad menor que el pan fresco elaborado con masa no congelada (Tabla 3.7). La redistribución de agua producida durante el almacenamiento a -18°C de la masa podría afectar los perfiles de difracción del almidón durante el almacenamiento de los panes ya que se sabe que el agua forma parte

integral de la estructura cristalina y de la fase amorfa del almidón. Zobel y Kulp (1996) informaron que el pan almacenado a una humedad relativa de 98% presentó un pico característico de la estructura B más intenso y agudo que el pan almacenado sin corteza y embolsado para evitar la pérdida de humedad debido a un mayor grado de hidratación de la estructura cristalina. Ambos panes presentaron una estructura B hidratada durante el almacenamiento, en el segundo caso el grado de hidratación sólo pudo haber resultado de migración de agua a las regiones cristalinas durante el almacenamiento. La fuente más probable del agua es la fracción amorfa en la miga. Sin embargo debería realizarse un mayor número de experiencias para poder describir el mecanismo por el cual esta distribución de agua afecta los difractogramas de rayos-X.

Los panes obtenidos de masas no congeladas y almacenados a 20°C mostraron una menor velocidad de recristalización y un menor grado de estructura B que los panes almacenados a 3°C después de 7 días de almacenamiento. Dos mecanismos han sido descritos para explicar un menor grado de estructura B en muestras almacenadas a temperatura más elevadas. Primero que estas temperaturas pueden impedir la formación de núcleos cristalinos y/o la reunión de doble hélices en estructuras cristalinas regulares. La formación de doble hélices contribuye a la gelificación y son precursores de la cristalización en preparaciones con almidón. Segundo, el mejoramiento de la formación de estructura tipo V a temperaturas selectas podría afectar la formación de la estructura B (Zobel y Kulp 1996).

La recristalización de estructura tipo B de panes obtenidos de masas congeladas fue similar a ambas temperaturas de envejecimiento.

Tabla 3.7. Resultados de los análisis cuantitativos de la cristalinidad relativa de los patrones de rayos-X de la miga de pan almacenada por 7 días. Intensidad del halo amorfo, HA, cristalinidad total relativa, TC, grado de cristalinidad tipo B, G t-B, y tipo V, G t-V.

		Tipo de cristalinidad	Tiempo de envejecimiento de pan (días)				
			0	1	3	6	7
Masa no congelada	Pan almacenado a 20°C	HA (cuentas)	147	132	142	150	137
		T C (%)	22,6	21,9	29,1	27,7	26,8
		G (t-B) (%)	6,8	8,3	9,7	10,9	11,8
		G (t-V) (%)	10,1	5,8	9,1	6,4	8,0
	Pan almacenado a 3°C	HA (cuentas)	147	127	136	126	120
		T C (%)	22,6	24,3	27,4	32,7	31,8
		G (t-B) (%)	6,8	9,4	11,4	12,6	14,0
		G (t-V) (%)	10,1	6,6	5,0	8,9	6,7
Masa congelada	Pan almacenado a 20°C	HA (cuentas)	110	123	129	119	109
		T C (%)	20,7	21,8	25,7	30,4	31,6
		G (t-B) (%)	6,4	7,8	8,7	10,4	13,6
		G (t-V) (%)	5,2	4,9	7,0	6,9	7,8
	Pan almacenado a 3°C	HA (cuentas)	110	126	128	121	110
		T C (%)	20,7	25,5	30,2	32,4	32,3
		G (t-B) (%)	6,4	9,2	9,9	10,3	13,5
		G (t-V) (%)	5,2	6,9	6,9	6,1	8,0

En la Tabla 3.8 se muestran los coeficientes de Pearson entre los valores de entalpía de retrogradación de la amilopectina medidos por DSC y la recrystalización de estructura B del almidón medidos por difracción de rayos-X durante el envejecimiento del pan. Los valores de entalpía de retrogradación mostraron coeficientes altos de correlación con los datos de recrystalización medidos por difracción de rayos-X para la estructura tipo B.

Los valores de los coeficientes fueron más altos para panes elaborados con masa no congelada que para los producidos con masa congelada. Como se dijo anteriormente, la redistribución de agua producida durante el almacenamiento de la masa afectó los difractogramas de rayos-X, y esto se tradujo en un menor grado de correlación.

Tabla 3.8. Coeficientes de correlación (Pearson) entre la entalpía de retrogradación medida por DSC y la recristalización de estructura tipo B del almidón medida por difracción de rayos-X durante el almacenamiento de pan.

Masa no congelada		Masa congelada	
Pan envejecido a 20°C	Pan envejecido a 3°C	Pan envejecido a 20°C	Pan envejecido a 3°C
0,963	0,984	0,850	0,848

Levadura

Efecto de la congelación de la masa y la levadura prensada sobre el proceso de elaboración de pan

Con el objetivo de dilucidar el efecto de la congelación de la masa sobre las células de levadura se determinaron las características de los panes elaborados con masas congeladas y con masas no congeladas que incluyeron en su formulación levadura congelada por distintos tiempos. En la Figura 3.14 se observa la variación del volumen de la hogaza de pan. La congelación de la masa de pan y de la levadura prensada a -18°C produjo una disminución del volumen de pan obtenido, pero no se encontraron diferencias significativas entre ambos volúmenes, posiblemente debido a que el tiempo de fermentación final fue mayor para las masas previamente congeladas que para las masas no congeladas elaboradas con células congeladas (Figura 3.15).

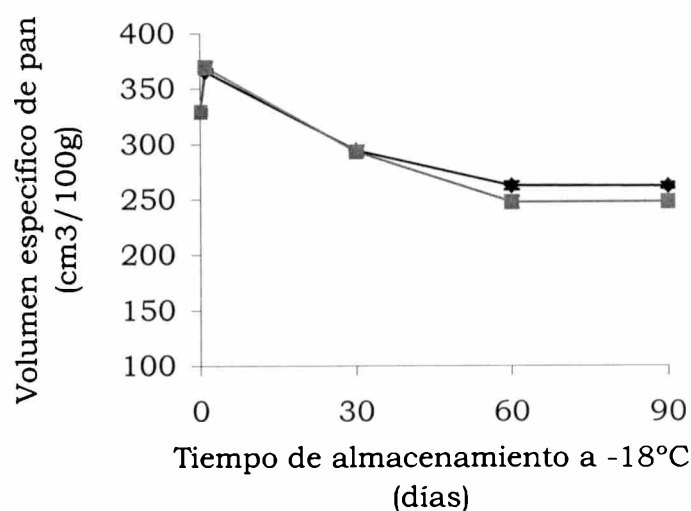


Figura 3.14. Cambios producidos en el volumen de pan obtenido con masa congelada (-◆-) y desde masa no congelada elaborada con levadura congelada (-■-).

El tiempo de fermentación aumentó significativamente ($p < 0,05$) en ambos tipos de masa (elaboradas con masa congelada y con masa no congelada utilizando levaduras congeladas) alcanzando los 210 min y los 180 min a los 90 días de almacenamiento de la masa y de levadura respectivamente. El incremento en el tiempo de fermentación puede ser debido a una pérdida en la viabilidad de las células y en la capacidad de producción de gas (Inoue y Bushuk 1992, Lorenz y Kulp 1995).

Las masas almacenadas a baja temperatura mostraron un mayor tiempo de fermentación que las masas no congeladas y elaboradas con levadura congelada para todos los tiempos analizados.

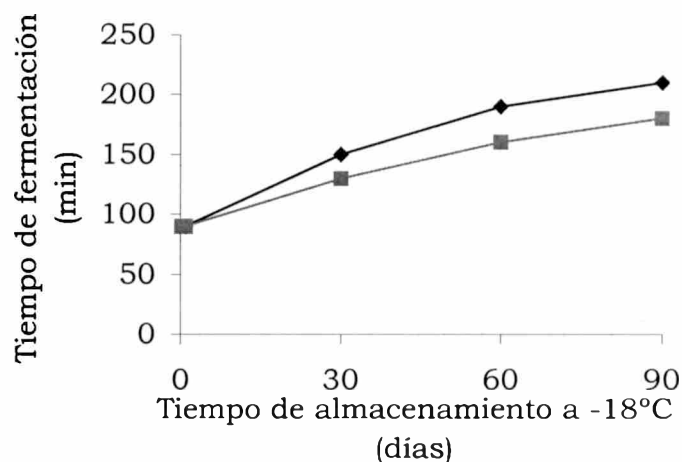


Figura 3.15. Cambios producidos en el tiempo de fermentación en masa congelada (-◆-) y masa no congelada elaborada con levadura congelada (-■-)

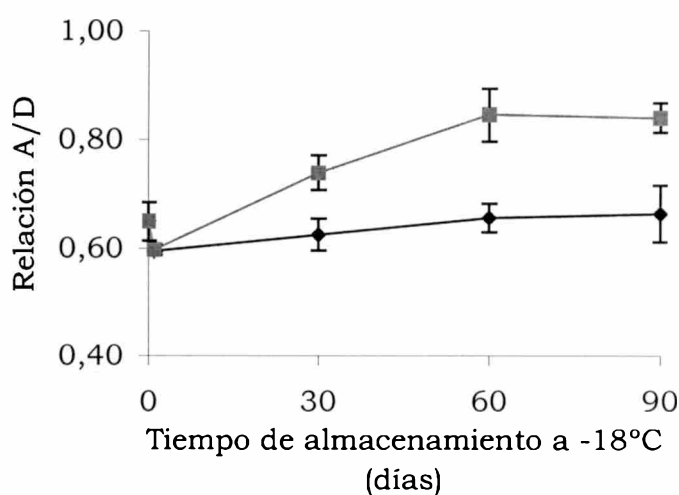


Figura 3.16. Cambios producidos en la relación entre el alto y el ancho de la hogaza de pan (A/D) obtenido de masa congelada (-◆-) y con masa no congelada elaborada con levadura congelada (-■-).

Los cambios en la elasticidad de la masa fueron seguidos por las modificaciones en la relación entre el alto y el ancho de la hogaza de pan (A/D) (Figura 3.16). La relación A/D de los panes elaborados con masa sometida a los procesos de congelación y almacenamiento permaneció casi constante, mientras que aumentó para los panes obtenidos con masa no congelada a la que se le adicionó levadura congelada. La relación A/D es

mayor para masas fuertes. Los cambios en el tiempo de fermentación y en la relación A/D podrían estar relacionados con las pérdidas en la viabilidad y en la capacidad de producción de gas de las células de levadura y probablemente, en la capacidad de retención de dióxido de carbono en la masa por la depolimerización de la matriz proteica durante el período de congelación (Varriano-Marston et al 1980, Berglund et al 1991, Inoue y Bushuk 1992, Autio y Sinda 1992).

Efecto de la congelación de levadura sobre la capacidad de producción de gas y la viabilidad celular

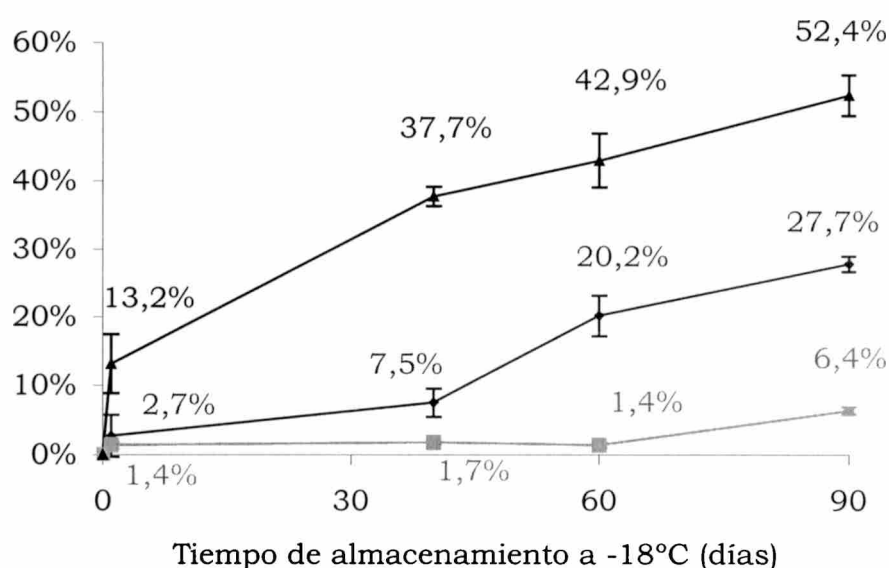


Figura 3.17. Efecto del proceso de congelación sobre la capacidad de producción de gas de las células de levadura (-●-), el porcentaje de levaduras muertas por la congelación de la masa (-▲-), y el porcentaje de células muertas por la congelación de la levadura (-■-).

La Figura 3.17 muestra los efectos del proceso de congelación de levadura sobre la producción de CO₂ y el porcentaje de levaduras muertas. La producción de gas disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con el tiempo de almacenamiento a -18°C. Las pérdidas en la producción de gas alcanzaron el 27,7 % a los 90 días de almacenamiento de las levaduras a -18°C. Estos

resultados concuerdan con los publicados por otros investigadores (Wolt y D'appolonia 1984a, Inoue et al 1994, El-Hady et al 1996).

Mediante el teñido con “trypan blue” se pudo determinar el número de células muertas por la congelación. La levadura no congelada presentó una cantidad importante de células muertas (6,6 % del total), mientras que el almacenamiento a -18°C de la dispersión de levaduras incrementó este número. El porcentaje de células no viables aumentó en forma significativa ($p<0,05$) (6,4 % con respecto al porcentaje inicial) después de 90 días de almacenamiento a -18°C . La muerte de levaduras durante el proceso de congelación y almacenamiento en estado congelado no explicó totalmente la disminución en la capacidad de producción de gas, lo que sugiere que la congelación de levadura causó una disminución en el número de células viables y, también, en la capacidad de producción de CO_2 de las levaduras sobrevivientes.

Por otro lado, se estudió el efecto del proceso de congelación de la masa sobre la viabilidad de las células de las levaduras presentes en la misma, mediante la siembra de masa en PDA (agar papa-dextrosa). En la Figura 3.18 se muestra el desarrollo de las células luego de 96 h de incubación. La congelación de la masa causó mermas significativas ($p<0,05$) en la cantidad de células de levaduras viables, y las pérdidas aumentaron con el tiempo de almacenamiento a -18°C llegando a un 52,4 % del valor inicial después de 90 días (Figura 3.17). La congelación de la levadura formando parte de la masa incrementa la susceptibilidad al daño celular, comparado con la congelación directa de la levadura, debido a que cuando las células forman parte del sistema de la masa están sujetas a cierta presión osmótica y se encuentran en un estado de fermentación activa (Lorenz y Kulp 1995). En este estado las levaduras tienen una membrana plasmática más fina que cuando se encuentran en dormancia, consecuentemente son más susceptibles al daño celular. Además los componentes orgánicos están concentrados en la fase acuosa por el proceso de congelación, lo que puede causar autólisis de las células (Stauffer 1993).

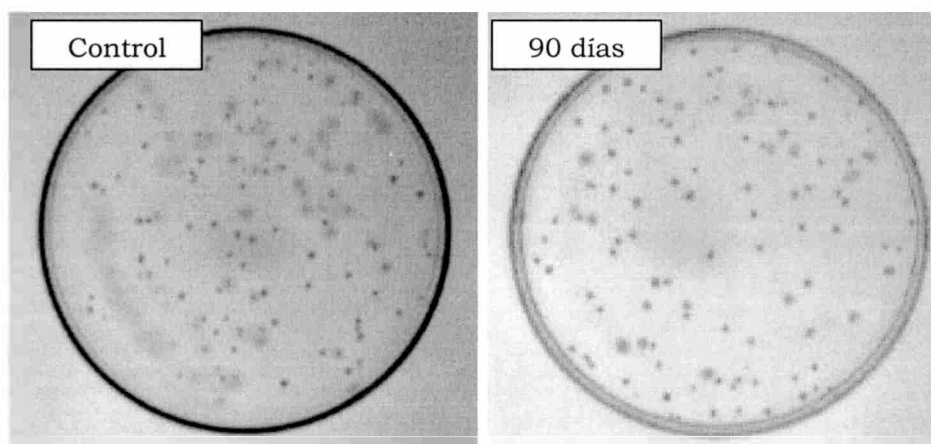


Figura 3.18. Cultivo de levaduras a partir de masa no congelada (control) y de masa congelada por 90 días.

Paralelamente, se estudió el efecto de ciclos de descongelación - congelación de la masa junto con el almacenamiento a -18°C . Las masas congeladas y almacenadas por distintos tiempos fueron sometidas a un ciclo de descongelación - congelación el día anterior a su descongelación total, para esto se colocó la masa congelada 45 min a 4°C , y posteriormente se llevó, nuevamente, a -18°C . Al día siguiente, se descongeló totalmente la masa y se incubaron las células de la misma forma que se describió en Materiales y Métodos. El ciclo de descongelación - congelación de la masa sumado al almacenamiento a la misma temperatura de la masa provocó la muerte de las células de levadura. El porcentaje de células de levadura muertas durante este ensayo fue menor que cuando se sometió a la masa sólo al almacenamiento a -18°C (Tabla 3.9). Se necesita más información para poder explicar el efecto del ciclo de descongelación - congelación sobre la viabilidad de las células de levadura.

Tabla 3.9. Efecto de un ciclo de descongelación - congelación (D-C) de la masa y del almacenamiento de la masa a -18°C sobre la viabilidad de las células de levadura.

	Tiempo de almacenamiento a -18°C		
	40 días	60 días	90 días
Masa con 1 ciclo D-C	$27,0 \pm 2,6\%$	$35,0 \pm 5,9\%$	$45,9 \pm 1,1\%$
Masa sin ciclo D-C	$37,7 \pm 1,4\%$	$42,9 \pm 3,9\%$	$52,4 \pm 2,9\%$

Influencia de los lixiviados de las células sobre las proteínas del gluten y la calidad del pan

La Tabla 3.10 presenta los resultados correspondientes a la evaluación de los lixiviados obtenidos de masa congelada y almacenada a -18°C por distintos tiempos y de masa no congelada. La concentración de nitrógeno de los lixiviados se incrementó significativamente ($p < 0,05$) a partir de los 40 días de almacenamiento a -18°C de la levadura. Las sustancias reductoras totales (SRT) encontradas en los lixiviados de levadura sin congelar fue muy bajo, pero aumentó significativamente ($p < 0,05$) al aumentar el período de almacenamiento a -18°C de la levadura. Paralelamente, el valor de pH de los lixiviados disminuyó con el tiempo de almacenamiento a esta temperatura, indicando que las sustancias liberadas poseen carácter ácido. Estos resultados revelaron que la congelación de la levadura originó la liberación de sustancias al medio a partir de las células muertas.

La cantidad de proteínas de gluten solubilizadas por los lixiviados de levaduras no cambió significativamente ($p < 0,05$) con la congelación de las células.

Tabla 3.10. Efecto de la congelación de levaduras sobre la cantidad de proteínas y sustancias reductoras presentes en los lixiviados y sobre la solubilidad de las proteínas de gluten.

Análisis	Levadura no congelada	Tiempo de almacenamiento a -18°C de la levadura (días)			
		1	40	60	90
Nitrógeno ¹	0,028±0,003a	0,014±0,005a	0,118±0,003c	0,085±0,018b	0,126±0,001c
Nitrógeno extraído ²	0,336±0,042h	0,311±0,009h	0,292±0,031h	0,287±0,134h	0,321±0,033h
SRT ³	0,08±0,02k	0,37±0,03l	0,44±0,03m	0,66±0,01n	1,18±0,04o
pH	6,10	5,91	5,05	4,97	5,07

1 [mg de nitrógeno por mL de lixiviado].

2 [mg de nitrógeno extraído del gluten por mL de lixiviado].

3 [mg de I₂ consumido por g de levadura] (Método 10-01, AACC 1995).

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

Las proteínas del gluten solubilizadas por los lixiviados fueron analizadas por SDS-PAGE para evaluar el efecto de las sustancias liberadas por las células (Figura 3.19). Un extracto proteico adicional realizado con agua destilada fue incluido como control. Los perfiles electroforéticos mostraron que la intensidad de tñido de las fracciones proteicas aumentó con el tiempo de congelación de la levadura, indicando un incremento de la cantidad de proteínas solubilizadas por los lixiviados, aunque este incremento no se reflejó en la concentración de proteínas analizada por el método de Kjeldahl. Esta contradicción puede ser explicada por la mayor sensibilidad del SDS-PAGE.

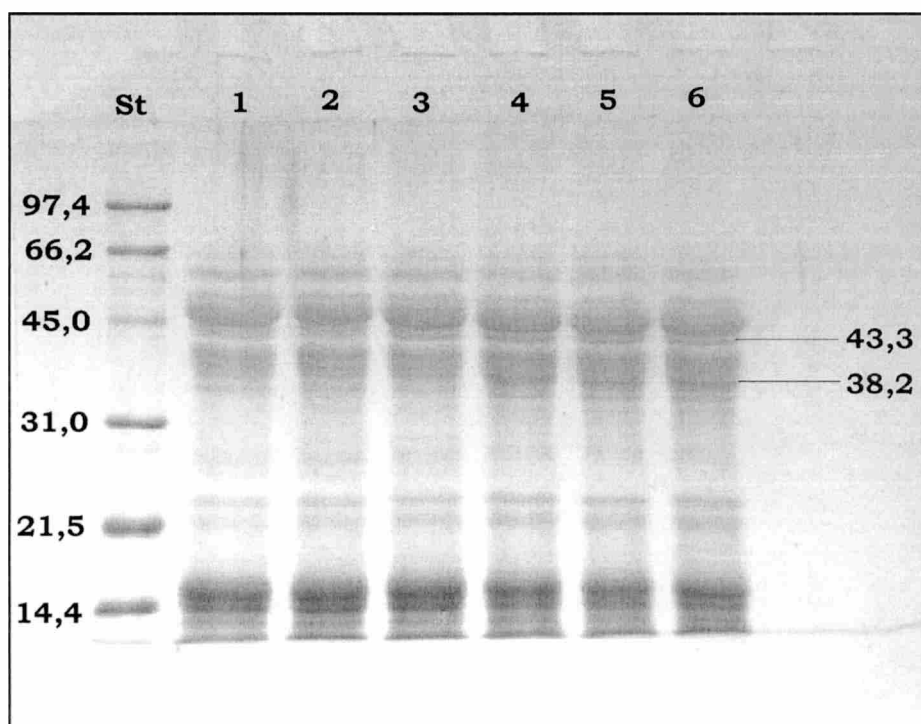


Figura 3.19. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas del gluten. ST: estándar de peso molecular. Líneas 1: gluten + agua, 2: gluten + lixiviado de levadura no congelada, 3: gluten + lixiviado de levadura congelada por 1 día, 4: gluten + lixiviado de levadura congelada y almacenada por 40 días, 5: gluten lixiviado de levadura congelada y almacenada por 60 días, y 6: gluten + lixiviado de levadura congelada y almacenada por 90 días.

Tabla 3.11. Efecto de los lixiviados de levadura sobre la cantidad relativa de proteínas de masa molecular 43,3 y 38,2 kDa solubilizadas desde gluten.

Masa molecular (kDa)	Tiempo de almacenamiento a -18°C de la levadura (días)					
	Agua	0	1	40	60	90
43,3	0,000	0,000	0,000	0,027	0,031	0,026
38,2	0,000	0,000	0,029	0,082	0,071	0,076

Los análisis densitométricos mostraron que la cantidad relativa de polipéptidos de masa molecular 43,3 y 38,2 kDa incrementó a partir de los 40 días de almacenamiento de la levadura a -18°C (Tabla 3.11). Esto indica que las sustancias liberadas por las células muertas causaron una reducción gradual y un incremento de la solubilidad de algunas proteínas del gluten.

En la Figura 3.20 se presentan los perfiles cromatográficos de los lixiviados de las células y los extractos proteicos realizados con agua destilada y con los lixiviados de levadura congelada y no congelada sobre el gluten vital.

Las proteínas lixiviadas de las células de levadura fueron fraccionadas en 4 picos, p1', p2', p3' y p4' (línea gris en los perfiles de las Figuras 3.19b, c y d). El área relativa de p1' y p4' (masa molecular aproximada de 5,8 y 0,3 kDa respectivamente) aumentó con el tiempo de almacenamiento a -18°C de la levadura. La fracción correspondiente al p4' posee una masa molecular cercana al tripéptido glutatión (masa molecular 0,307 kDa), que posee grupos tioles (SH) y, por lo tanto, poder reductor.

Las proteínas solubilizadas del gluten por el agua (control) fueron fraccionadas en 5 grandes picos según su tamaño molecular, como muestra la Figura 3.19a. La masa molecular de estos picos es p1: $116,5 \pm 5,6$ kDa, p2: $36,3 \pm 3,4$ kDa, p3: $7,8 \pm 0,2$ kDa, p4: $1,1 \pm 0,0$ kDa y p5: $0,3 \pm 0,0$ kDa. Un nuevo pico (p_n) de masa molecular 5,8 kDa apareció cuando los extractos preparados con los lixiviados de las células fueron fraccionados (línea negra en los perfiles de las Figuras 3.19b, c y d). Los picos p_n y p5 corresponden a los picos p1' y p4' de los lixiviados de levadura, lo que indica que los perfiles cromatográficos de los extractos proteicos preparados con los lixiviados no cambiaron significativamente ($p < 0,05$) con la congelación de la levadura.

La Figura 3.21 muestra los efectos de la incorporación de los lixiviados de las células de levadura en el proceso de elaboración de pan (los lixiviados se incluyeron en la masa reemplazando parte del agua). La incorporación de los lixiviados de levadura congelada y no congelada en la formulación de la masa provocó una disminución del volumen de la hogaza. La magnitud de

los cambios negativos provocados en el pan se incrementó con el aumento del tiempo de almacenamiento de la levadura a -18°C . Esto indica que la reducción de las proteínas del gluten provocada por las sustancias liberadas desde las células de levadura muertas, causó un debilitamiento de la estructura de la masa.

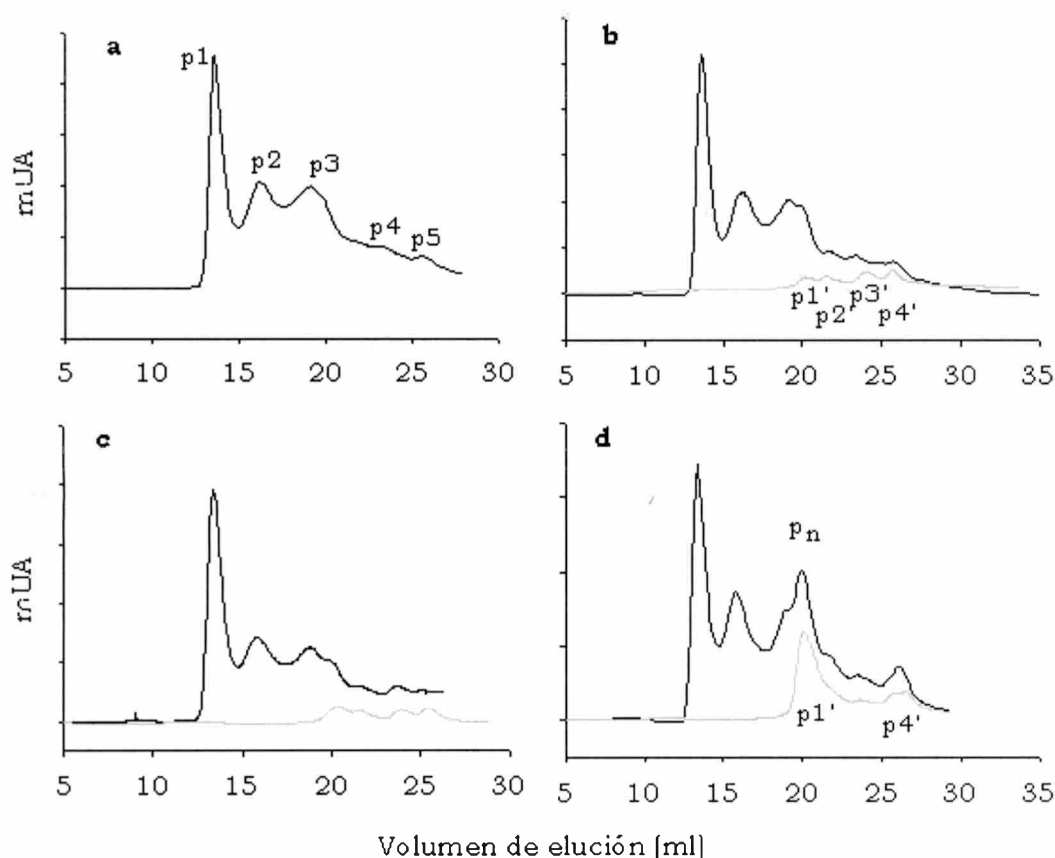


Figure 3.20. Perfiles cromatográficos de las proteínas lixiviadas por las levaduras (gris) y los extractos proteicos obtenidos del gluten (negro) por agua (a) y lixiviados de levadura no congelada (b) y congelada y almacenada a -18°C por 1 (c) y 90 (d) días.

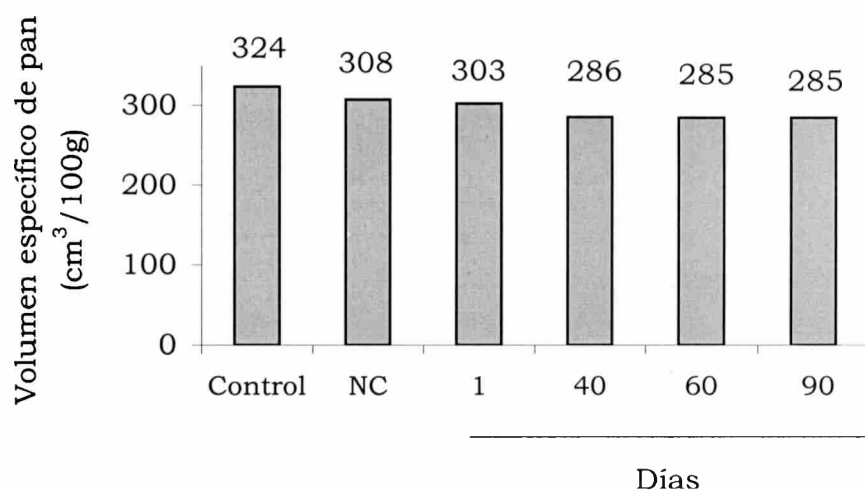


Figura 3.21. Efecto del agregado de los lixiviados de levadura congelada y no congelada sobre el volumen de pan. Control: formulación base; NC: formulación con lixiviado de levadura no congelada. 1, 40, 60 y 90: formulaciones con lixiviados de levadura congelada por 1, 40, 60 y 90 días, respectivamente.

Los análisis de correlación (Tabla 3.12) mostraron que la pérdida de volumen y el aumento del tiempo de fermentación de masas congeladas están totalmente afectados por los cambios producidos en las propiedades de las células de levadura, como la capacidad de producción de gas y la cantidad de células muertas. Además, la cantidad de sustancias reductoras y las proteínas liberadas por las células de levadura, el área relativa de p_n y p_5 ; todos parámetros indicativos de las características de las sustancias liberadas por la congelación de las células de levadura, exhibieron correlaciones altas con los parámetros representativos de la calidad de los panes. Estos resultados confirmaron que las sustancias liberadas por la congelación de la levadura tienen un importante efecto sobre su comportamiento y la calidad de las masas congeladas.

Tabla 3.12. Correlaciones obtenidas entre los distintos parámetros medidos.

		A		B		C		D	E		F	G	p _n	p ₅
		MC	LC	MC	LC	MC	LC		LC	MC				
A	MC	1,000	0,998	-0,736	-0,995	-0,981	-0,972	-0,915	-0,763	-0,909	-0,790	-0,862	-0,815	-0,983
	LC		1,000	-0,772	-0,996	-0,975	-0,970	-0,921	-0,761	-0,887	-0,789	-0,837	-0,808	-0,985
B	MC			1,000	0,751	0,638	0,646	0,625	0,397	0,404	0,424	0,468	0,468	0,813
	LC				1,000	0,987	0,985	0,945	0,812	0,907	0,836	0,853	0,855	0,994
C	MC					1,000	0,998	0,964	0,869	0,960	0,890	0,874	0,903	0,975
	LC						1,000	0,976	0,892	0,952	0,911	0,862	0,921	0,977
D								1,000	0,936	0,904	0,954	0,748	0,949	0,955
E	LC								1,000	0,872	0,998	0,727	0,994	0,829
	MC									1,000	0,887	0,903	0,927	0,906
F											1,000	0,732	0,993	0,850
G												1,000	0,943	0,985
p _n													1,000	0,872
p ₅														1,000

A: Volumen de pan; B: relación A/D; C: tiempo de fermentación; D: Pérdida de la producción de CO₂ de la levadura; E: Porcentaje de células muestras; F: Sustancias reductoras totales liberadas por las células de levadura y G: proteínas liberadas por las células de levadura en el lixiviado. MC: masa congelada. LC: levadura congelada. P_n y p₅: área de pico en los perfiles cromatográficos.

El análisis de las proteínas que forman parte de la masa, mediante electroforesis y cromatografía de exclusión molecular, mostró que los agregados de gluteninas solubles en SDS sufrieron una depolimerización durante la congelación, y éste proceso fue mayor al aumentar el período de almacenamiento a -18°C. Se observó una disminución de las gluteninas de alta masa molecular (129,1-88,7 kDa) en los agregados que forman parte de la red de gluten, con el almacenamiento de la masa congelada.

La simulación de los procesos de congelación - descongelación, fermentación, horneado y envejecimiento en el calorímetro diferencial de barrido permitió el análisis de los cambios ocurridos en el almidón. Los resultados indicaron que la congelación y el almacenamiento en estado congelado de la masa modificaron las propiedades del almidón. Estas modificaciones fueron reflejadas levemente durante el proceso de gelatinización, pero tuvieron una influencia importante en la velocidad de retrogradación y en la cantidad de amilopectina que retrogradó. También se observó que la velocidad de retrogradación de amilopectina, en masas previamente horneadas en el DSC, fue más alta mientras menor fue la temperatura de envejecimiento. Esta diferencia fue más evidente en masas congeladas y almacenadas a -18°C .

La difracción de rayos-X permitió detectar el tipo de estructura cristalina formada durante el proceso de envejecimiento del pan. La estructura tipo B aumentó progresivamente durante el envejecimiento del pan, mientras que la tipo V apareció al poco tiempo de almacenamiento, y no sufrió cambios significativos con el transcurso del tiempo. Además, se determinó que el grado de cristalinidad total no fue un buen parámetro para seguir el proceso de retrogradación del almidón. La velocidad de recristalización y la cantidad de almidón recristalizado en estructura tipo B, fue mayor mientras menor fue la temperatura de envejecimiento de los panes. El proceso de congelación de la masa no afectó la velocidad de recristalización del almidón en pan determinada por difracción de rayos-X.

La congelación de las levaduras incremento el número de células muertas, causó pérdidas en la capacidad de producción de CO_2 y en la calidad de las levaduras para elaborar pan. Esto se evidenció en menores volúmenes de pan y mayores tiempos de fermentación. Sin embargo, la congelación de la masa tuvo efectos más negativos sobre la calidad del pan que la congelación de la levadura prensada, lo que se reflejó en mayores tiempos de fermentación y cantidad de células de levadura muertas, y en panes más chatos.

Las células de levadura no congeladas mostraron una cantidad alta de células muertas, pero su lixiviado contenía una cantidad pequeña de sustancias reductoras. Con el aumento del tiempo de almacenamiento en estado congelado se incrementó la cantidad de células muertas y, en mayor proporción, la cantidad de sustancias reductoras liberadas por las células de levadura.

Las proteínas del gluten fueron afectadas por los lixiviados de las células de levadura congeladas y almacenadas a -18°C , como quedó demostrado por SDS-PAGE. Paralelamente, se observó, por cromatografía de exclusión molecular, que al aumentar el tiempo de almacenamiento en estado congelado de las células se incrementó la cantidad relativa de proteínas de masa molecular baja liberadas.

La hipótesis de que estas sustancias pueden afectar la calidad del pan quedó corroborada con el uso de estos lixiviados en la formulación de pan, que produjo hogazas de menor volumen.

CUARTA SECCIÓN

EFECTO DE LOS ADITIVOS EN MASAS CONGELADAS

Uso de aditivos en masas congeladas

Los aditivos son usados en productos horneados para facilitar el procesamiento, compensar variaciones en las materias primas, garantizar una calidad constante, y preservar la frescura y la calidad de los alimentos. Varios factores juegan un rol importante en la calidad del pan producido a partir de masa congelada. Ha sido demostrado que la congelación afecta la viabilidad, la capacidad de producción de gas de las levaduras y produce la liberación de sustancias que afectan la estructura del gluten. Otro factor importante es el deterioro de la red de gluten durante el proceso de congelación de la masa, lo que provoca una disminución en la elasticidad y la fuerza de la masa y en la capacidad de retención de CO₂. Estos efectos pueden ser reducidos utilizando harinas muy fuertes (Wolt y D'Appolonia 1984b, Inoue y Bushuk 1992), o agregando agentes reforzadores de la masa como gluten vital (Wang y Ponte 1994, Wang y Ponte 1995), emulsionantes como ésteres de mono y diglicéridos del ácido diacetiltartárico (DATEM) (Inoue et al 1995, Sahlstrom et al 1999) y oxidantes como ácido ascórbico y bromato de potasio (Kenny et al 1999, El-Hady et al 1999).

Como quedó demostrado en la sección previa y en otros trabajos la redistribución y la recristalización de agua durante el proceso de congelación de la masa afectaron las propiedades del almidón (Autio y Sinda 1992, Lu y Grant 1999). En masas congeladas son deseable niveles bajos de absorción de agua dado que limitan la cantidad de agua congelable. Un alto nivel de agua libre es dañino para la estructura de la masa y las levaduras durante el proceso de congelación y descongelación (Lorenz y Kulp 1995). Algunos polisacáridos con gran capacidad para ligar agua, como goma guar, goma xántica y goma garrofin, se utilizan como estabilizantes de alimentos congelados debido a que producen una reducción del crecimiento de los cristales de hielo (Alexander 1999, Milo Ohr 2001).

En esta sección se estudió el efecto de diferentes aditivos sobre las propiedades de las masas congeladas y almacenadas a -18°C y de los

panes. En una primera etapa se trabajó con un grupo amplio de aditivos (gluten, goma guar, DATEM, harina de soja) para determinar el efecto sobre las características de las masas congeladas y no congeladas. Seguidamente, se seleccionaron dos de ellos (DATEM y goma guar) y se realizaron estudios complementarios.

Las fotografías de los panes obtenidos a partir de masas no congeladas y congeladas y almacenadas por 60 días a -18°C (Figura 4.1) muestran los efectos de estos procesos, tales como la disminución de volumen y el cambio de forma de la hogaza. La pérdida de fuerza de la masa durante el proceso de congelación produjo panes con una estructura de miga más compacta y una forma de hogaza más chata en todas las muestras. Por otro lado, puede observarse una gran diferencia de volumen y en la estructura de la miga que produjo el agregado de ciertos aditivos, como gluten y DATEM, tanto en panes elaborados con masas congelada y almacenada como no congelada. La miga del pan elaborado con masa no congelada conteniendo DATEM, y en menor medida con gluten, presenta una estructura con alvéolos grandes y elongados, característicos de una masa fuerte y un pan más elástico o gomoso ("chewiness"). Durante el moldeado, la masa es aplastada y elongada, y luego enrollada en un cilindro. Las celdas son estiradas alrededor del cilindro, si la masa es fuerte la elongación persiste hasta el fin de la fermentación y el horneado (Hoseney 1994b). Esta característica de los alvéolos desaparece después de 60 días de almacenamiento a -18°C debido a la pérdida de fuerza en la masa.

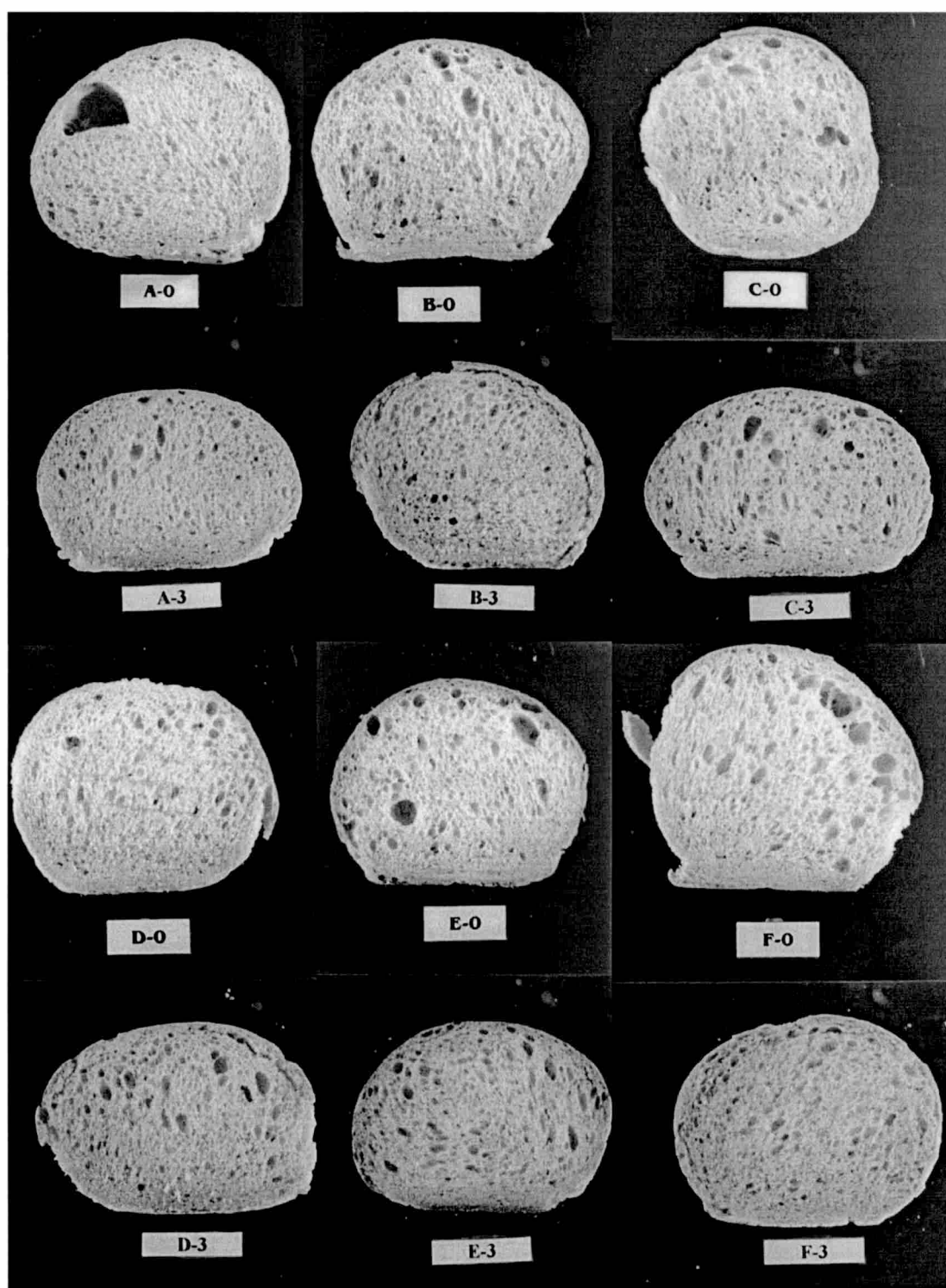


Figura 4.1. Fotografías de la miga de pan obtenido de masas congeladas y almacenadas a -18°C por 60 días (3) y no congeladas (0). Masa control (A), masa con gluten (B), 5 % de levadura (C), goma guar (D), harina de soja (E) y DATEM (F).

En la Figura 4.2 se observa la variación del volumen de los panes obtenidos a partir de masas congeladas y almacenadas por distintos tiempos y de masa no congelada con aditivos. Las masas frescas con aditivos produjeron panes con mayor volumen que el control, excepto las que contenían harina de soja, quizás debido a que este componente se utilizó en altas concentraciones. La mayor diferencia se registró con el DATEM.

En todos los casos, el volumen de pan disminuyó con el tiempo de almacenamiento a -18°C . El deterioro observado fue mayor en los primeros 4 días de almacenamiento. La pérdida de volumen después de 60 días de almacenamiento a -18°C fue de un 14,8 %, 20,3 %, 13,6 %, 11,3 %, 8,5 % y 15,2 % para masa control, masas con gluten, DATEM, levadura 5 %, goma guar y harina de soja, respectivamente. Después del período completo de almacenamiento, las masas suplementadas con aditivos (excepto con harina de soja) y las masas con un mayor porcentaje de levaduras originaron panes con mayor volumen que aquellos preparados con la formulación base. Los mejores panes se obtuvieron con DATEM y goma guar.

Los resultados indican que sólo un mayor porcentaje de levaduras y el agregado de goma guar disminuyeron los efectos nocivos de la congelación de la masa, mientras que los otros aditivos lograron mejorar el volumen, debido a un aumento del volumen de pan inicial (masa no congelada).

El mecanismo por el cual la goma guar mejora las características de las masas congeladas podría atribuirse, haciendo una analogía con la teoría esbozada para postres y helados congelados (Alexander 1999, Belitz y Grosch 1999a), a una reducción del tamaño de los cristales de hielo por la disminución de agua libre del sistema y, consecuentemente una disminución del daño mecánico causado sobre la estructura del gluten.

Con respecto al uso de un mayor porcentaje de levadura en la masa, es lógico que al tener más cantidad de células, exista una mayor

producción de gas, lo que se refleja en menores tiempos de fermentación y mayor volumen de pan.

Por otro lado, el uso de gluten y de DATEM produjo un aumento del volumen de pan, obtenido de masa congelada y almacenada y no congelada, debido al efecto reforzador sobre la red de gluten, proporcionándole una mayor estabilidad y mejorando la capacidad de retención de gases. Se considera que el mecanismo por el cual los emulsionantes con alto balance hidrofílico - lipofílico, como el DATEM, producen masas más fuertes, es debido a que la cola lipofílica de la molécula se une con las proteínas hidrofóbicas del gluten (el 40 % de los aminoácidos del gluten son hidrofóbicos). Esta unión promovería la agregación de las proteínas del gluten en la masa por la neutralización de las cargas positivas superficiales, es decir, los grupos cargados negativamente de los emulsionantes contribuyen a incrementar las fuerzas electrostáticas atractivas con las cargas superficiales positivas de las proteínas (Kamel y Ponte 1993, Armero y Collar 1998). Otra teoría se basa en las propiedades físicas de los lípidos polares (galactolípidos o fosfolípidos presentes en la harina, y surfactantes como el DATEM o el esteaoril lactilato de sodio) y su capacidad para formar fases líquidas - cristalinas en agua. Los lípidos polares de la harina son esenciales para la calidad de los productos horneados y su función en la masa puede ser vista como estabilizantes de espumas. De acuerdo a este concepto, estas moléculas polares están asociadas con proteínas en estructuras líquido - cristalinas en la fase acuosa que rodea las burbujas de gas y los gránulos de almidón en la masa, y consecuentemente, contribuyen a la elasticidad, permitiendo que las celdas de gas se expandan y provoquen un aumento del volumen de los productos panificados. Los surfactantes, probablemente, actúen de la misma forma que los lípidos naturales de la harina y mejoren su desempeño en el proceso de panificación (Tamstorf et al 1986).

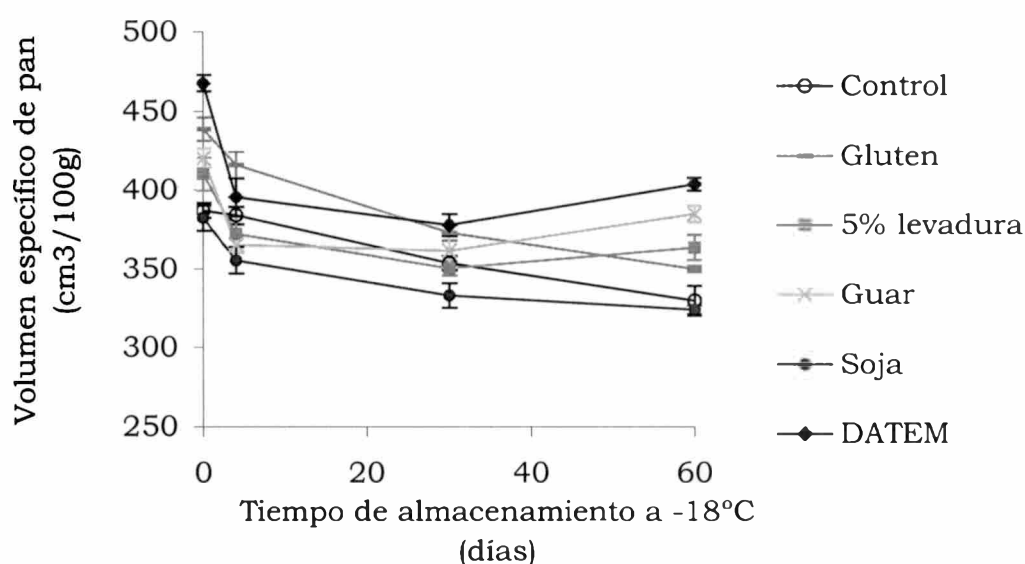


Figura 4.2. Efecto de la congelación y almacenamiento de la masa a -18°C sobre el volumen de pan.

En la Figura 4.3 se observan los tiempos de fermentación alcanzados con las distintas formulaciones de masas congeladas y almacenadas a -18°C y no congeladas. En masas no congeladas, sólo la formulada con un mayor porcentaje de levadura mostró un menor tiempo de fermentación que la masa control. El resto de las masas tuvo el mismo tiempo de fermentación que el control. El tiempo de fermentación aumentó con el tiempo de almacenamiento a -18°C de las masas, aditivadas o no. Las masas con mayor porcentaje de levadura presentaron los tiempos de fermentación más bajos, aunque mostraron un deterioro apreciable a los 60 días de almacenamiento a -18°C. El agregado de aditivos produjo un aumento del tiempo de fermentación con respecto a la masa control al aumentar el tiempo de almacenamiento congelado, la mayor diferencia se registró con el DATEM. Sólo las masas con goma guar a los 60 días de almacenamiento presentaron un tiempo de fermentación menor.

Es aceptado comúnmente que la congelación y el almacenamiento a temperaturas bajo cero afecta la capacidad de producción de gas de las levaduras (Gélinas et al 1994, El-Hady et al 1996, Hsu et al 1979a). El

aumento del tiempo de fermentación fue más evidente en masas con aditivos ya que estos producen un refuerzo de la matriz de la masa y, en algunos casos, una masa más seca; consecuentemente se necesita mayor presión de gas para producir el aumento de volumen.

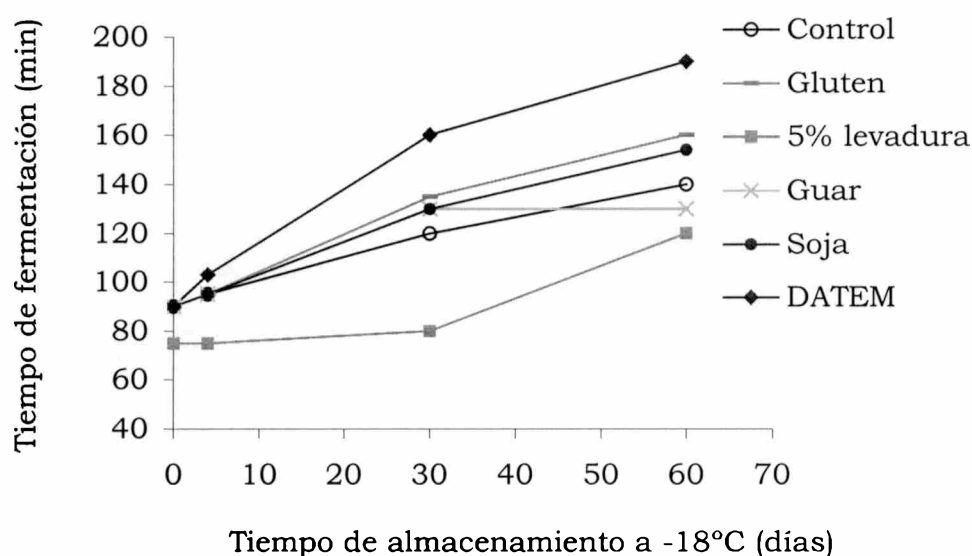


Figura 4.3. Efecto de la congelación y almacenamiento de la masa a -18°C sobre el tiempo de fermentación.

La Figura 4.4 muestra el área porcentual de alvéolos de la hogaza de pan obtenido de masas con y sin aditivos. Los panes elaborados con masas congeladas y almacenadas mostraron un mayor valor del área porcentual de celdas que aquellos obtenidos a partir de masas que no fueron congeladas, indicando que el pan producido a partir de masas congeladas posee una estructura con mayor proporción de alvéolos. Estos datos coinciden con los publicados por Wolt y D'appolonia (1984b), quienes examinando visualmente la apariencia externa e interna de panes, concluyeron que el almacenamiento en estado congelado produce una estructura de grano más abierta. Los panes suplementados con harina de soja tuvieron una estructura de grano más compacta a pesar del almacenamiento a -18°C.

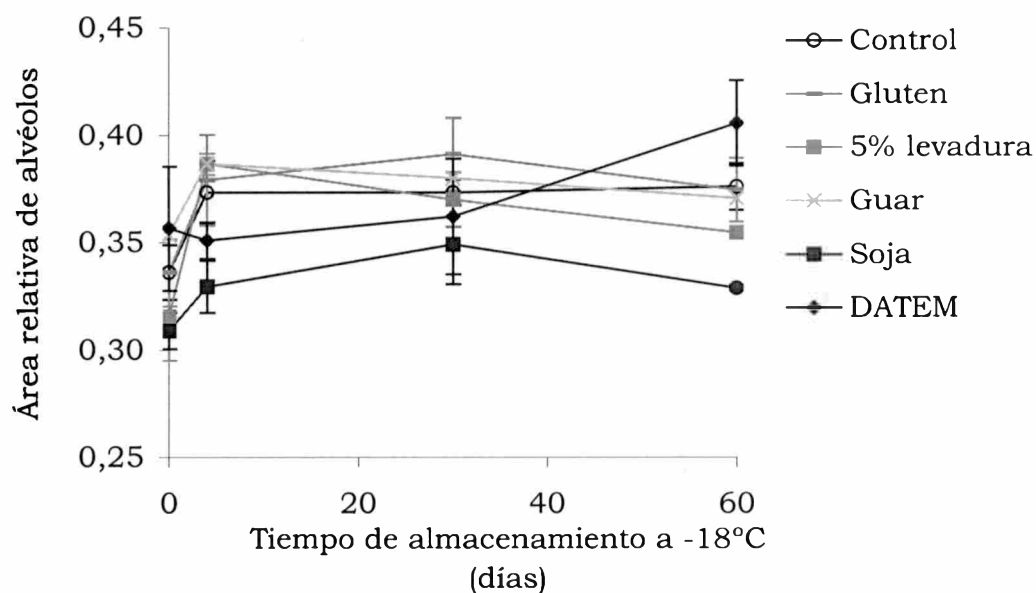


Figura 4.4. Efecto de la congelación y almacenamiento a -18°C de la masa sobre el área relativa de alvéolos en panes.

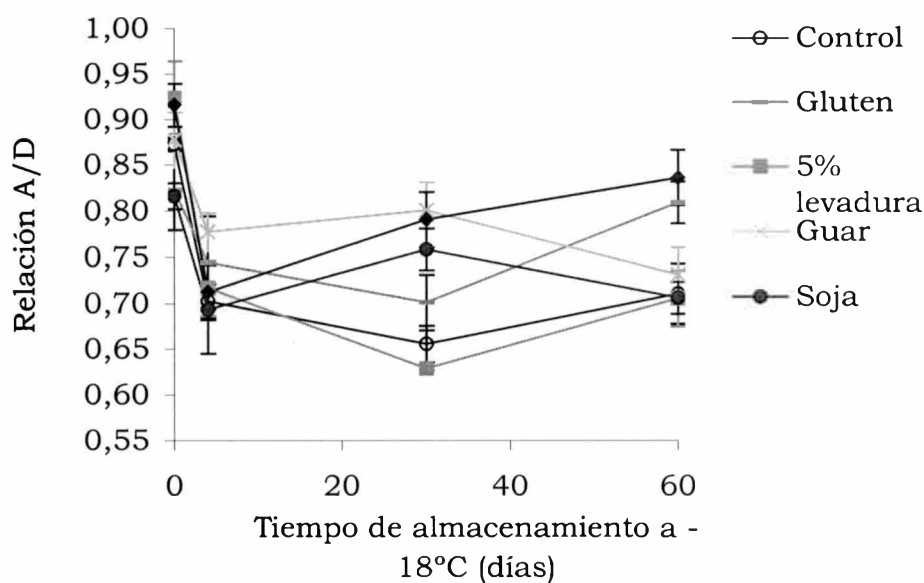


Figura 4.5. Efecto de la congelación y almacenamiento a -18°C de la masa sobre la relación alto/diámetro del pan.

La relación alto/ancho de la hogaza de pan (A/D) disminuyó con la congelación en masas con y sin aditivos (Figura 4.5), indicando una pérdida de elasticidad de la matriz panaria como consecuencia de la congelación y almacenamiento congelado. Todos los aditivos agregados mejoraron la capacidad de las masas para retener su forma durante la descongelación, fermentado, y posterior horneado. Mientras que el control y la masa con mayor contenido de levadura tuvieron un desempeño más pobre. Estos resultados pueden explicarse porque los aditivos usados mejoran la calidad de las masas congeladas por un mecanismo distinto a la supervivencia de las levaduras, probablemente reforzando las propiedades estructurales del gluten.

Efecto de la congelación de masas con aditivos sobre el endurecimiento del pan

En las Figuras 4.6 y 4.7 se observa la influencia de la congelación de la masa con aditivos sobre la velocidad de endurecimiento de la miga de pan almacenado a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$. En todos los lotes la firmeza aumentó significativamente ($p < 0,05$) con el tiempo de almacenamiento del pan. Los panes elaborados con DATEM presentaron menor firmeza que los obtenidos con la formulación base (control) y con goma guar, a partir de masa congelada y no congelada. La firmeza de la miga está relacionada con el volumen de pan, mientras mayor es el volumen y más finas son las celdas de gas, menores son los valores de firmeza obtenidos (Eliasson y Larson 1993a, Zobel y Kulp 1996). Por otro lado, los surfactantes, como el DATEM, tienen la capacidad de interaccionar o de formar complejos con el almidón, particularmente con la fracción de amilosa, lo que retarda el envejecimiento del pan. También pueden disminuir la velocidad de endurecimiento por la formación de complejos con la fracción de amilopectina dentro de los gránulos de almidón. Aunque existe una controversia sobre si ciertos surfactantes producen panes más blandos o si retardan la velocidad de endurecimiento de la miga (Kamel y Ponte 1993); los resultados encontrados en este trabajo indican que producen

ambos efectos, quizás debido a que la formulación base utilizada en este estudio no incluye más lípidos que los propios de la harina.

Los panes elaborados con DATEM y envejecidos a 3°C presentaron una velocidad de endurecimiento mayor cuando se obtuvieron de masas congeladas y almacenadas 60 días a -18°C que cuando fueron elaborados con masa no congelada.

Todos las muestras elaboradas con goma guar presentaron valores iniciales de firmeza (1 h de horneado) similares a las elaboradas con la formulación base, pero mostraron una velocidad de endurecimiento menor, tanto en masas congeladas como no congeladas (Figura 4.6). Ciertas gomas (guar, xantano, agar, etc.) absorben hasta 6 veces su peso en agua. Aunque, el incremento de la absorción de agua en las masas que contienen gomas es relativamente bajo debido a los pequeños niveles usados en productos de panificación (0,01 % a 0,5 %), la cantidad adicional de agua que retienen las gomas, inclusive después del horneado, puede significar un beneficio en la humedad del producto. Además, algunas gomas producen migas más gomosas y elásticas, lo que puede ser percibido como mas blando o fresco (Heflich 1996).

La congelación de la masa con goma guar no provocó diferencias significativas en la firmeza de la miga de pan a las temperaturas de envejecimiento ensayadas.

Por otro lado, la temperatura de almacenamiento influyó en la velocidad de endurecimiento de los panes con aditivos. Los panes envejecidos a 3°C mostraron una velocidad de endurecimiento más alta, en los primeros 3 días de almacenamiento. Estos resultados coinciden con los publicados por Pisesookbunterng y D'appolonia (1983), quienes trabajando con masas sin congelar, encontraron que panes almacenados a 2°C presentaron mayores valores de firmeza que panes almacenados a 30°C. Después de 7 días de almacenamiento a 3°C sólo las masas con DATEM que fueron congeladas mostraron mayor firmeza que las masas almacenadas a 20°C.

En función de la formulación y del proceso de elaboración usados para obtener los panes, la aceptabilidad del producto no supera los 3 días de almacenamiento, en las condiciones utilizadas en el ensayo.

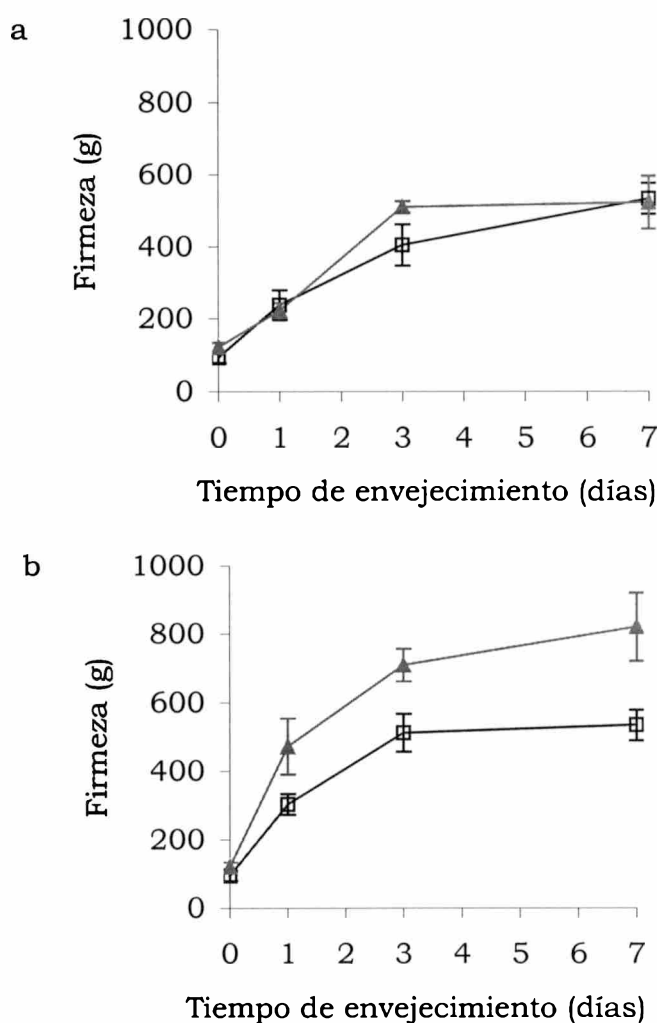


Figura 4.6. Variación de la firmeza de la miga de pan almacenada a 20°C (a) y a 3°C (b) obtenida de masa con DATEM congelada (▲) y no congelada (□).

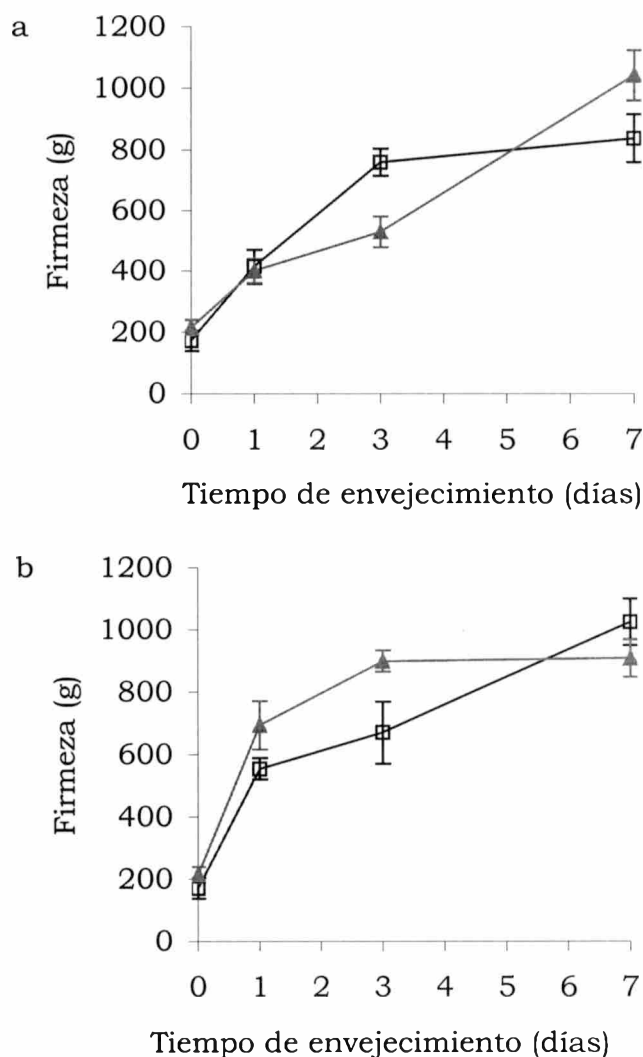


Figura 4.7. Variación de la firmeza de la miga de pan almacenada a 20°C (a) y 3°C (b) obtenido de masa con goma guar congelada (▲) y no congelada (□).

Efecto de la congelación sobre la gelatinización del almidón en masas con aditivos

La Tabla 4.1 muestra la influencia del proceso de congelación sobre el proceso de gelatinización del almidón en masas con y sin aditivos. El cambio de la entalpía involucrada en el proceso de gelatinización mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre masas congeladas y no congeladas, y entre masas no congeladas formuladas con y sin aditivos. Las masas no congeladas elaboradas con aditivos presentaron valores de

entalpía de gelatinización (ΔH_g) y entalpía de fusión del complejo amilosa - lípido (ΔH_m) mayores que las masas no congeladas producidas con la formulación base. Mientras que las masas elaboradas con goma guar presentaron los valores más altos de ΔH_g .

El almacenamiento a -18°C produjo un aumento del ΔH_g en la masa control y una disminución en las masas con goma guar. La entalpía de fusión del complejo amilosa - lípido en masas no aditivadas se incrementó con el tiempo de almacenamiento, mientras que las masas aditivadas no mostraron cambios significativos.

El proceso de congelación no modificó la T_o y el ΔT_g , de las muestras analizadas.

Tabla 4.1. Efecto de la congelación de la masa con aditivos sobre la temperatura de inicio, T_o , el rango de temperatura de gelatinización, ΔT_g , la entalpía de gelatinización del almidón, ΔH_g y la entalpía de fusión del complejo amilosa - lípido ΔH_m .

Masa	Tiempo de almacenamiento a -18°C (días)	T_o ($^\circ\text{C}$)	ΔT_g ($^\circ\text{C}$)	ΔH_g (mJ/mg)	ΔH_m (mJ/mg)
Control	0	53,5 \pm 0,8a	45,5 \pm 0,6ef	3,31 \pm 0,01g	0,43 \pm 0,04o
	60	56,9 \pm 0,3b	44,0 \pm 0,2ef	3,62 \pm 0,03gh	0,54 \pm 0,09op
	120	54,4 \pm 2,5ab	48,9 \pm 4,1f	4,41 \pm 0,27j	0,83 \pm 0,02pq
DATEM	0	53,4 \pm 0,9a	47,3 \pm 1,4ef	3,89 \pm 0,06hi	0,75 \pm 0,10opq
	60	54,2 \pm 1,5ab	47,2 \pm 2,3ef	3,91 \pm 0,03hi	0,60 \pm 0,35op
	120	54,8 \pm 2,3ab	45,9 \pm 3,3ef	3,68 \pm 0,06gh	1,01 \pm 0,13q
Goma guar	0	56,4 \pm 1,1ab	46,4 \pm 1,6ef	4,25 \pm 0,38ij	0,73 \pm 0,15opq
	60	56,6 \pm 1,3ab	43,6 \pm 0,4e	3,60 \pm 0,41gh	0,61 \pm 0,61op
	120	55,6 \pm 1,1ab	46,9 \pm 2,1ef	3,93 \pm 0,18hij	0,81 \pm 0,09pq

Christianson et al (1981), trabajando con un viscosímetro, encontraron que la viscosidad de las pastas de almidón aumentó por la adición de pequeñas cantidades de gomas (guar y xantano), y sugirieron que durante el proceso de formación de la pasta de almidón se produjeron fuertes asociaciones entre el almidón soluble (amilosa) y las gomas. Por otro lado, Ghiasi et al (1983), por DSC observaron una disminución relativa en el área del primer pico (M1) con respecto a la del segundo pico (M2) en las muestras con harina, almidón - gluten, o almidón - xantano comparadas con las de almidón; este comportamiento fue atribuido al hecho que el gluten y las gomas actúan como agentes ligantes de agua, por lo que parte del agua ligada a estas sustancias es utilizable para la gelatinización del almidón, pero parte no es aprovechable.

Efecto de la congelación de masas con aditivos sobre el comportamiento viscoelástico

El análisis de los módulos elástico y viscoso, y de la viscosidad compleja de masas con aditivos (Figura 4.8) revela que el comportamiento es similar al de las masas control (sin aditivo), correspondiente al de un gel fuerte.

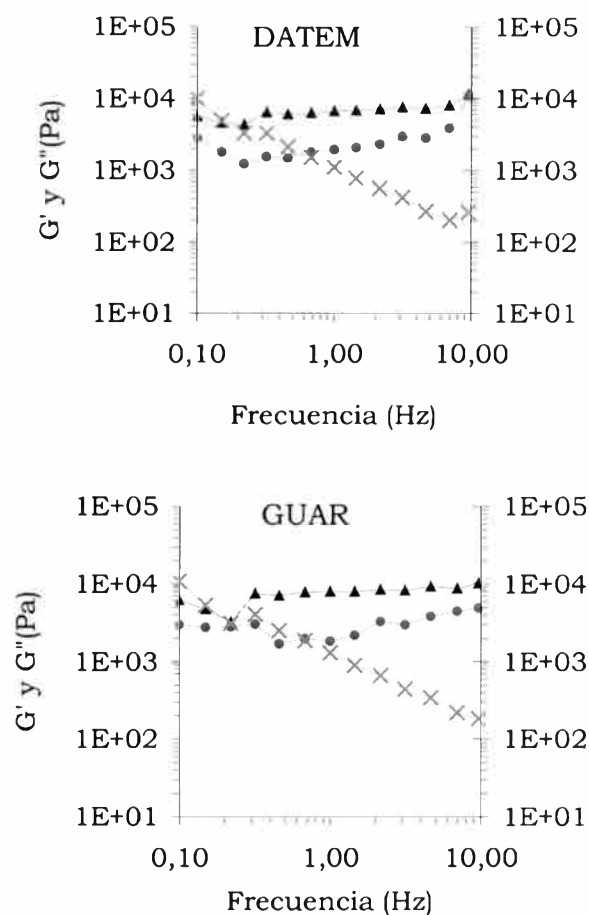


Figura 4.8. Comportamiento reológico de masa con aditivos no congelada. G' (-▲-), G'' (-●-), y η^* (x-).

Las Figuras 4.9 y 4.10 presentan la variación del módulo complejo (G^*), del módulo elástico (G') y de la viscosidad compleja (η^*) en masas aditivadas congeladas y no congeladas. Los parámetros reológicos medidos en masas aditivadas congeladas muestran el mismo comportamiento que en masa sin aditivos. El almacenamiento a -18°C por 1, 60 y 120 días produjo una leve variación, mientras que a 240 días se observó una gran caída en los valores de estos parámetros.

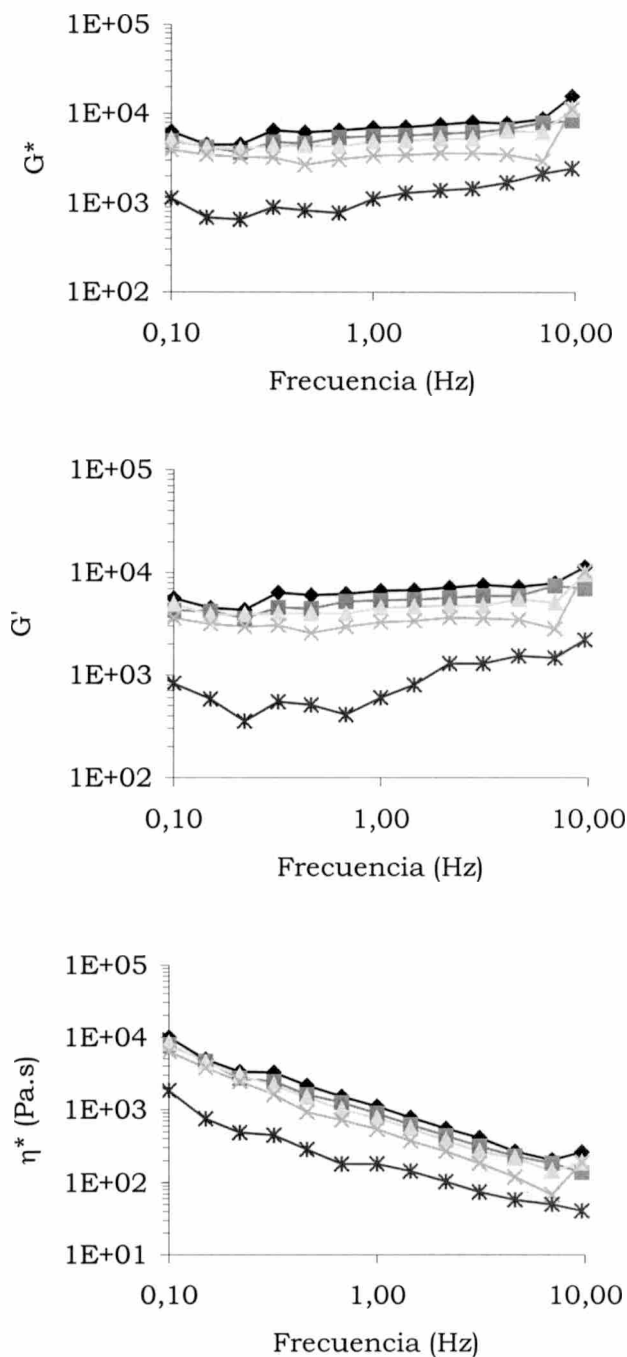


Figura 4.9. Efecto de la congelación y tiempo de almacenamiento a -18°C de las masas con DATEM sobre el módulo complejo, el módulo elástico y la viscosidad compleja. Masa no congelada (-◆-), masas congeladas y almacenadas a -18°C por 1 día (-■-), 60 días (○), 120 días (△) y 240 días (*-).

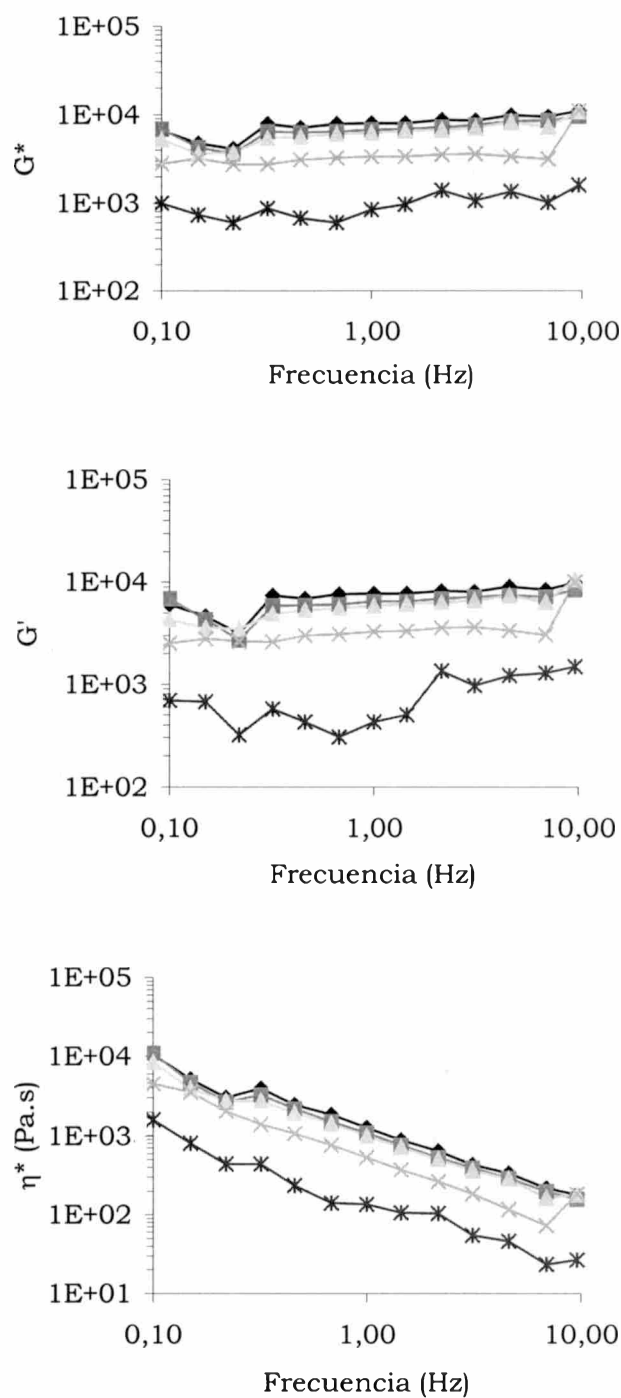


Figura 4.10. Efecto de la congelación y el tiempo de almacenamiento a -18°C de las masas con goma guar sobre el módulo complejo, el módulo elástico y la viscosidad dinámica. Masa no congelada (-◆-), masas congeladas y almacenadas a -18°C durante 1 día (-■-), 60 días (○), 120 días (△) y 240 días (-*-).

La Tabla 4.2 muestra el efecto de la congelación de la masa con aditivos sobre los parámetros viscoelásticos medidos a 1 Hz. La masa control no congelada presentó valores de G^* , G' y η^* similares a la masa con DATEM, en coincidencia con Kokelaar et al (1996) y Kenny et al (1999). Por el contrario, la masa con goma guar presentó valores de G^* , G' y η^* mayores que las masas control. Este cambio en el comportamiento viscoelástico de la masa con goma guar se puede explicar por la gran capacidad de las gomas de ligar agua, lo que provoca una reducción de la cantidad de agua disponible para la hidratación de los constituyentes de la harina durante el amasado. Cuando se aumenta el contenido de agua de una masa, el módulo elástico y viscoso y la tangente del ángulo de desfase disminuyen (Lindahl 1990, Masi et al 1998).

Tabla 4.2. Variación de los parámetros viscoelásticos con congelación y el tiempo de almacenamiento a -18°C de las masas con aditivos ($f=1$ Hz). Masa sin fermentación.

	Tiempo de almacenamiento a -18°C (días)	G^* (Pa)	G' (Pa)	η^* (Pa s)
DATEM	0	6925	6641	1102
	1	5589	5362	890
	60	4821	4510	767
	120	3380	3293	538
	240	1126	601	179
Goma guar	0	7966	7761	1268
	1	6791	6465	1081
	60	6264	5899	997
	120	3366	3275	536
	240	846	428	135

Los valores del módulo complejo, el módulo elástico y la viscosidad compleja disminuyeron con la congelación y el tiempo de almacenamiento a -18°C , mostrando una pérdida de elasticidad y un debilitamiento en la estructura de la masa. La caída de los valores fue más evidente a partir de los 120 días de almacenamiento. Las masas con aditivos no mostraron un comportamiento significativamente diferente a la masa control en el período de almacenamiento en estado congelado. Kenny et al (1999) encontraron una disminución del módulo complejo en masa congelada y descongelada, pero el almacenamiento en estado congelado no provocó una mayor caída de los valores. Después de 2, 5 y 8 semanas de almacenamiento las masas con aditivos (DATEM y estearil lactilato de sodio) presentaron valores más altos de G^* que la masa control. Estas diferencias pueden deberse a que el modo de elaboración de las masas congeladas - descongeladas empleado en este trabajo fue diferente.

De la misma forma que en masas control, las masas no congeladas con aditivos que no fueron fermentadas antes de ser analizadas en el reómetro presentaron valores de G^* , G' y η^* más altos que las que fueron fermentadas (Tabla 4.3). Esto indica que la fermentación de la masa provocó una caída en la consistencia y la elasticidad de la matriz. Las masas que se dejaron fermentar antes de ser analizadas en el reómetro también mostraron una disminución de G^* , G' Y η^* con el tiempo de almacenamiento a -18°C .

La goma guar produjo cambios significativos en masas no congeladas, pero no modificó el comportamiento de las masas a través del tiempo de almacenamiento a -18°C .

Tabla 4.3. Variación de los parámetros viscoelásticos con la congelación y el tiempo de almacenamiento a -18°C de las masas con aditivos (f=1 Hz).

Masa con fermentación

	Tiempo de almacenamiento a -18°C (días)	G*(Pa)	G' (Pa)	η^* (Pa s)
DATEM	0	6341	6118	1009
	1	7119	6768	1133
	60	4253	3982	677
	120	2903	2817	462
	240	1306	534	208
Goma guar	0	6833	6428	1088
	1	6382	6040	1016
	60	4706	4405	749
	120	3586	3500	571
	240	1083	611	172

Efecto de la congelación de las masas con aditivos sobre las proteínas de la harina

Se realizaron geles con “multitasking” (4, 6, 8, 10 y 12 % de acrilimida) (Figura 4.11) para separar los agregados proteicos de masas congeladas y almacenadas a -18°C por 60 días y no congeladas con las tres formulaciones (base, DATEM, goma guar). En la Figuras 4.12a y 4.12b se muestran los densitogramas correspondientes a las proteínas de masas congeladas y no congeladas sin aditivos (control), con DATEM y con goma guar. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre las muestras. El perfil electroforético no cambió debido a que el SDS utilizado en la solución de extracción, rompe las interacciones no covalentes entre los aditivos y las proteínas.

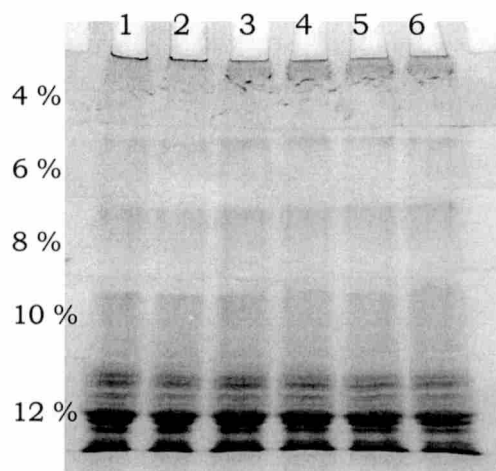


Figura 4.11. SDS-PAGE con “multistacking” de los extractos proteicos sin agente reductor de masas congeladas y no congeladas. Masa sin aditivos no congelada (1) y congelada y almacenada por 60 días (2). Masa con DATEM no congelada (3) y congelada (4). Masa con goma guar no congelada (5) y congelada (6). A la izquierda del gel se indican los porcentajes de acrilamida de cada capa.

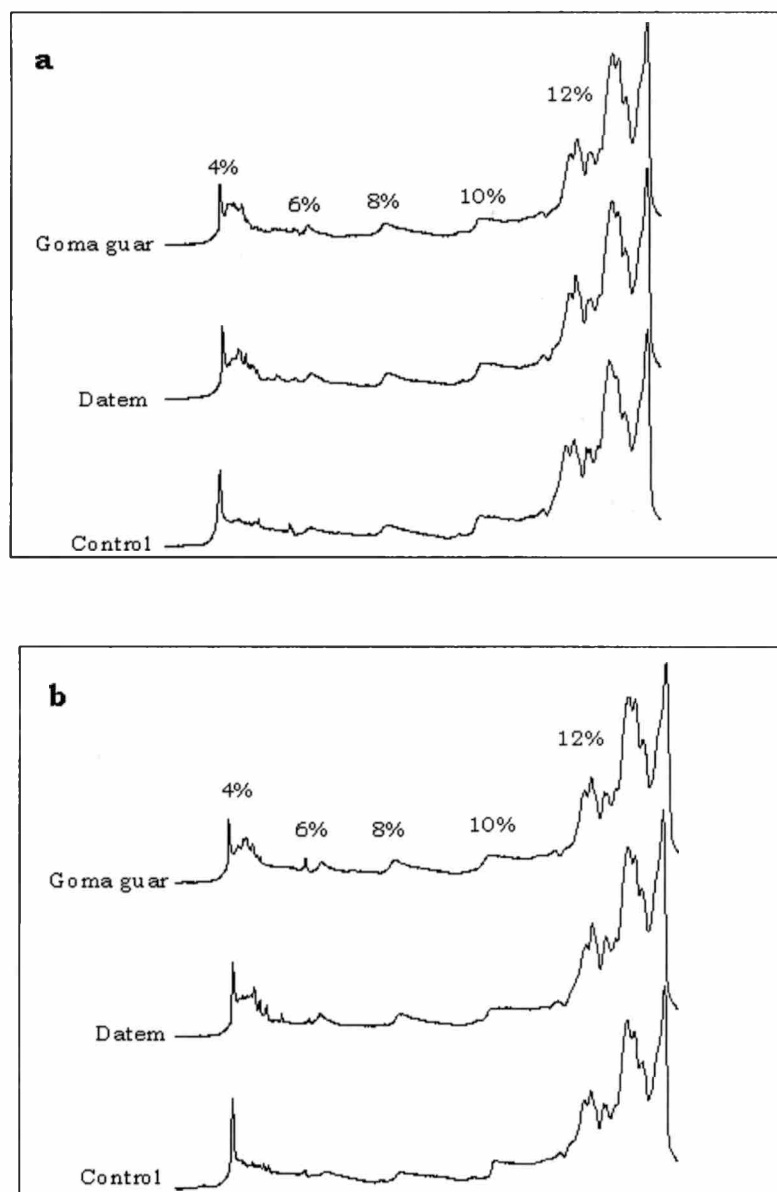


Figura 4.12 Perfil electroforético de los extractos proteicos de masas no congeladas (a) y congeladas (b).

Efecto de la congelación sobre la microestructura de masas con aditivos

En las Figuras 4.13 y 4.14 se muestran fotografías de la estructura de masa con DATEM y con goma guar respectivamente. Masa no congelada (a, c, e, g) y congelada y almacenada 60 días a -18°C (b, d, f, h). Aumentos (a y b: 600x, c y d: 1500x, e y f: 3600x, y g y h: 10000x).

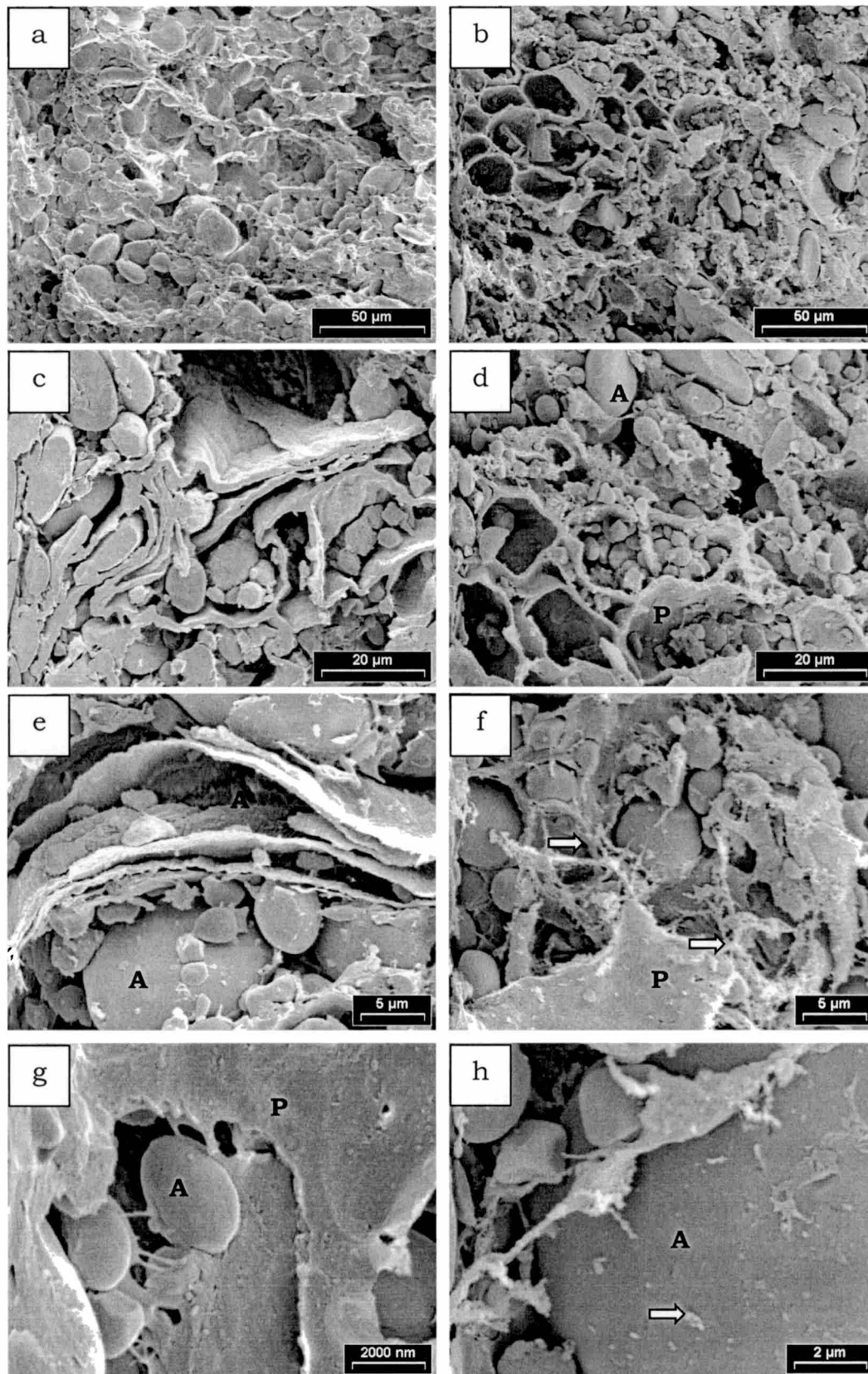


Figura 4.13. Microfotografías de masa elaborada con DATEM no congelada y congelada y almacenada por -18°C por 60 días con diferentes aumentos. P: red proteica, A: gránulos de almidón.

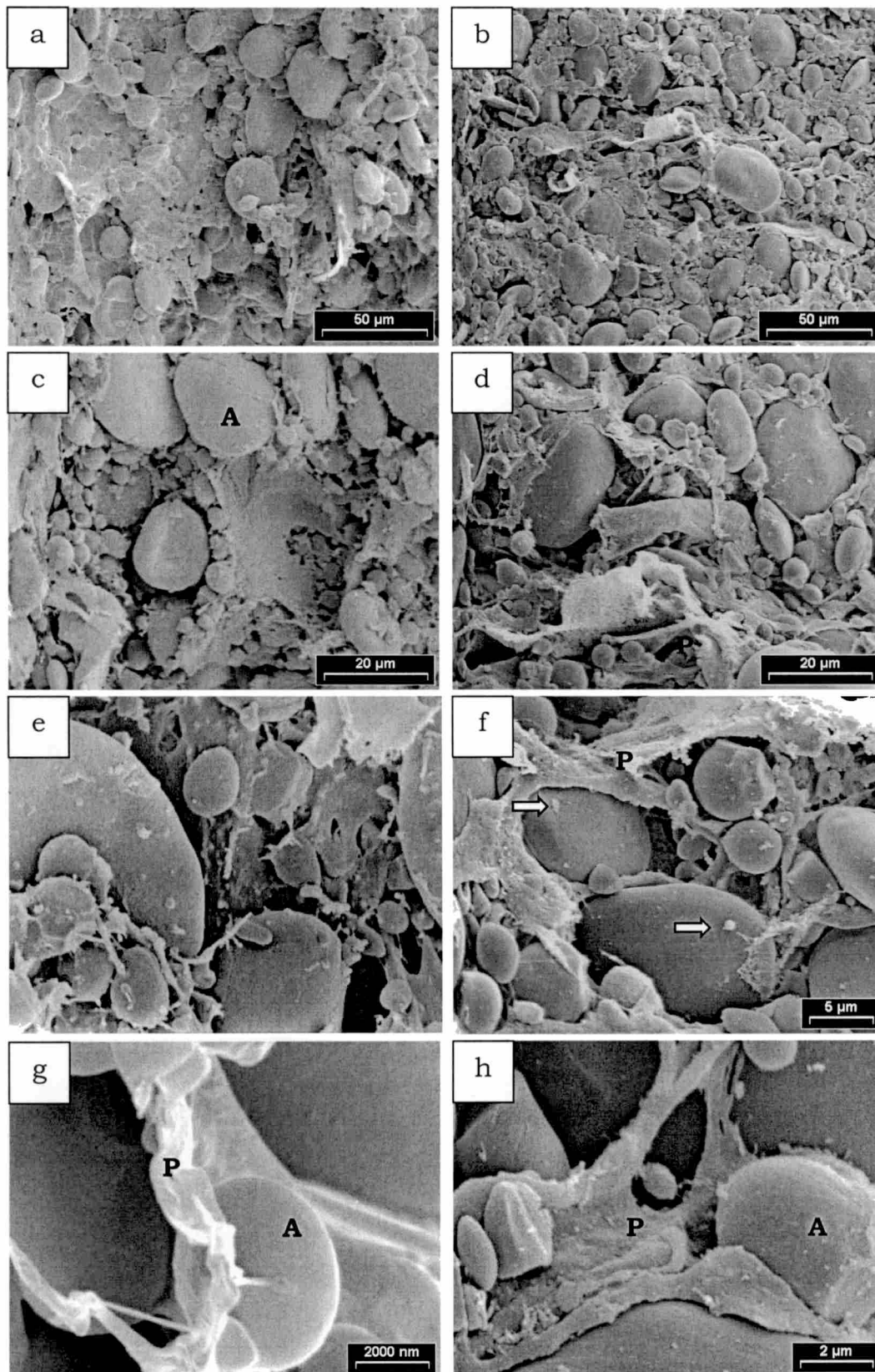


Figura 4.14. Microfotografías de masa elaborada con goma guar no congelada y congelada y almacenada a -18°C por 60 días con diferentes aumentos. P: red proteica, A: gránulos de almidón.

Como en las masas sin aditivos, las microfotografías permitieron ver claramente los gránulos de almidón (A) inmersos en la matriz de gluten (P). Las masas elaboradas con DATEM mostraron una estructura con más aire ocluido, menos densa, más abierta que las masas elaboradas con goma guar y con la formulación base, lo que indica que el emulsionante facilitó una mayor incorporación de aire durante el amasado. Ambas masas con aditivos y congeladas y almacenadas a -18°C por 60 días mostraron una estructura dañada, en donde pueden observarse las fibras de gluten más porosas y finas, y pequeños trozos de material de color blanco (flechas) que no están presentes en las masas no congeladas.

El uso de DATEM y gluten vital (reforzadores de la masa), de goma guar (estabilizante) y un mayor porcentaje de levaduras mejoró la calidad de los panes obtenidos con masas congeladas, como se reflejó en una mayor capacidad de las masas para retener su forma durante la elaboración, un mayor volumen de pan y una estructura más homogénea. Por el contrario ninguno de los aditivos logró reducir eficientemente el tiempo de fermentación de las piezas de masa congelada.

Los aditivos incluidos en la formulación de masas congeladas y no congeladas, DATEM y goma guar, tuvieron una influencia significativa en el proceso de endurecimiento de la miga de pan. Ambas sustancias retardaron la velocidad de endurecimiento comparada con la obtenida para muestras sin aditivos, mientras que sólo el emulsionante produjo una miga más blanda en el inicio del período de almacenamiento. La temperatura de envejecimiento de los panes tuvo influencia en este proceso sólo hasta el tercer día de almacenamiento, mientras menor fue la temperatura más alta fue la firmeza de la miga. Sólo los panes elaborados con DATEM y envejecidos a temperaturas de refrigeración mostraron mayor firmeza cuando se usaron masas congeladas para su obtención.

Los procesos de gelatinización del almidón y de fusión del complejo amilosa - lípido fueron afectados por el uso de DATEM y goma guar en la formulación como se reflejó en el aumento de entalpía, mientras que los

cambios provocados por la congelación fueron evidentes en masas sin aditivos.

El análisis de los parámetros viscoelásticos permitió detectar una caída en la resistencia y en la elasticidad de la masa con DATEM y goma guar como consecuencia de la congelación. La goma guar modificó el comportamiento viscoelástico como quedó demostrado por un refuerzo y un aumento de la elasticidad de las masas. La fermentación de la masa provocó una caída en la consistencia y la elasticidad de la misma, tanto en presencia como en ausencia de aditivos.

Las masas elaboradas con los dos aditivos presentaron una microestructura dañada, semejante a la masa no aditivada, por la congelación y almacenamiento a -18°C , mientras que el DATEM produjo una masa con microestructura más porosa que el resto de las masas.

QUINTA SECCIÓN

EFECTO DEL PROCESO DE PRECOCCIÓN DE MASA SOBRE LA CALIDAD DEL PAN

Los panes precocidos son productos convenientes para preparar pan fresco en cualquier momento. Estos productos parcialmente horneados (precocidos o “part-baked”) son elaborados en la planta donde son sometidos a una cocción parcial con tiempos y perfiles de temperatura especiales. Luego son distribuidos, almacenados y recalentados para obtener un producto recién horneado en el hogar o en los puntos de venta. La mayor ventaja de esta tecnología es su flexibilidad, debido a que el tiempo para obtener el pan fresco a partir del precocido es muy corto; mientras que el mayor problema es el control crítico del tiempo y la temperatura requeridos para la segunda cocción. El producto final posee una estructura abierta que puede secarse velozmente. Aun bajo condiciones óptimas algunos panes precocidos endurecen rápidamente luego del segundo horneado por lo que tienen que ser consumidos inmediatamente. Tres tipos de panes precocidos se usan en distintas partes del mundo, estos difieren en como se estabiliza la estructura del producto:

- Uno es preparado con un primer horneado a baja temperatura, prácticamente sin formación de corteza y color. Este tipo de pan tiende a arrugarse debido a que contiene una alta humedad y no está estabilizado por la corteza. Sin embargo, cuando se trata de productos de tamaño pequeño, como panecillos, que poseen una cantidad relativa mayor de corteza que de miga, no se produce el arrugado durante el almacenamiento a temperatura ambiente y pueden ser horneados en los hogares por los consumidores. La vida útil de estos productos es limitada debido a su alto contenido de humedad, y el crecimiento de hongos debe ser prevenido agregando altos niveles de preservadores químicos o envasando en una atmósfera modificada. Durante el segundo horneado se desarrolla el olor, sabor y color de la corteza. El tiempo y la temperatura de cocción son críticos ya que estos productos tienden a endurecer rápidamente.
- Otro tipo de pan es el que se prepara horneando casi completamente el producto y luego se congela en forma inmediata. El proceso de congelación

previene el endurecimiento de la miga y preserva la corteza previniendo la migración de humedad desde el interior del pan, lo que normalmente causa el envejecimiento de la corteza (menos frágil, más blanda y correosa). Esta tecnología es utilizada para elaborar productos con corteza. Los panes precocidos permanecen congelados hasta su segundo calentamiento a una temperatura relativamente baja para evitar un secado excesivo que causaría el endurecimiento rápido del producto final. Este último proceso se lleva a cabo en los locales para la venta del producto terminado y genera un olor y sabor atractivo de pan recién horneado. La desventaja principal de esta tecnología son los altos costos del almacenamiento a temperaturas de congelación, para grandes volúmenes de producto.

- En el último método de elaboración para este tipo de panes, se utiliza un enfriador bajo vacío para darle estabilidad a los productos precocidos sin almacenamiento a bajas temperaturas (de refrigeración o congelación). Este proceso estabiliza la corteza del pan precocido sin causar el arrugado y el encogimiento de la hogaza durante el almacenamiento a temperatura ambiente. El tiempo y la temperatura del segundo horneado son críticos. Con este tipo de elaboración junto a un control estricto en las condiciones de horneado, se producen panes de características indistinguibles con el pan fresco obtenido mediante el proceso clásico. Además, es más económico debido al ahorro que se logra al almacenar el producto a temperatura ambiente, aunque se requieren inversiones extras en la planta y en los lugares de venta (Leuschner et al 1998, Leuschner et al 1999, Anónimo 1999).

Efecto del tiempo de precocción y el almacenamiento de masa sobre la calidad del pan

Se estudió el efecto de la refrigeración sobre la masa precocida en la calidad del pan. Las masas fermentadas fueron precocidas por 4,5; 9,0 y 13,5 minutos. Estos tiempos corresponden al 25 %, 50 % y 75 % respectivamente del tiempo total de cocción (18 minutos). Posteriormente,

la masa se refrigeró a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ por distintos períodos de tiempo. Por último, se terminó la cocción de la masa hasta completar 20 min. Este aumento del tiempo total de horneado se debe a que la masa precocida se encuentra a una temperatura baja cuando se la somete a la cocción final.

La Figura 5.1 muestra el efecto del tiempo de precocción y del almacenamiento de la masa precocida sobre la pérdida porcentual de volumen de pan con respecto al pan sin precocción (control).

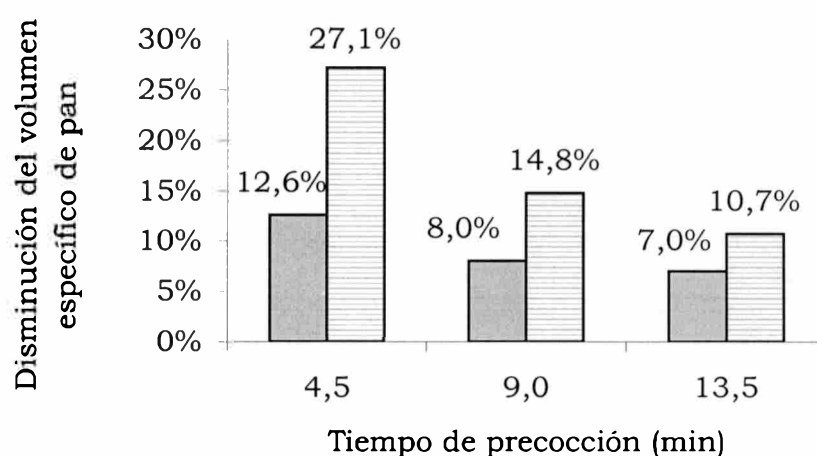


Figura 5.1. Efecto de la refrigeración de masas precocidas y almacenadas por 3 días (barras grises) y 8 días (barras rayadas) a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ sobre el volumen de pan. Disminución de volumen = $[V - V_1 / V] \times 100$. V_1 : volumen de pan obtenido a partir de masas pre-cocidas, V : volumen de pan sin precocción.

El volumen del pan obtenido a partir de masa precocida cambió significativamente con el tiempo de precocción y el tiempo de almacenamiento a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$. El volumen de pan disminuyó a medida que el período de refrigeración aumentó y el tiempo de precocción fue más corto.

Posteriormente se trabajó con masas precocidas (4,5; 9,0 y 13,5 min) y almacenadas a -18°C por 8 días. En la Figura 5.2 se observa la variación de la pérdida porcentual de volumen de pan con respecto al pan

para masas precocidas y almacenadas a -18°C .

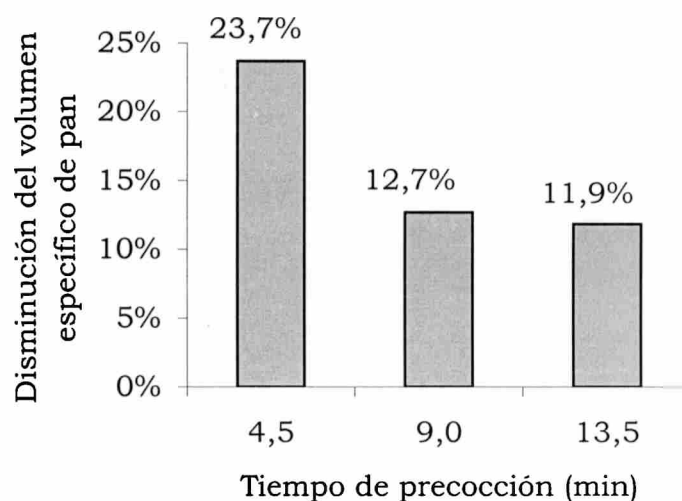


Figura 5.2. Efecto de la refrigeración de masas precocidas y almacenadas por 8 días -18°C sobre el volumen de pan.

El volumen de pan obtenido de masa precocida por diferentes tiempos y almacenada a -18°C experimentó una mayor disminución cuanto menor fue el tiempo de precocción de la masa. El deterioro fue inferior que en masas precocidas y almacenadas a 3°C .

En la Figura 5.3 puede observarse el efecto del tiempo de precocción y posterior refrigeración y congelación de masa sobre el aspecto interno de los panes. Algunos panes obtenidos de masas pre-cocidas presentaron la corteza separada de la miga (flecha Figura 5.3). La separación de la corteza podría deberse a dos fenómenos: (i) las diferentes velocidades de expansión y contracción de la corteza (la corteza se seca rápidamente en el horno) y la miga, que se produce durante los procesos de congelación y descongelación, debido a una considerable diferencia de humedad entre ellas (Brown 1985); (ii) cuando se congela el pan o la masa pre - cocida aún caliente, el vapor de agua que no ha salido, se deposita bajo la corteza y produce su separación (Quaglia 1991a).

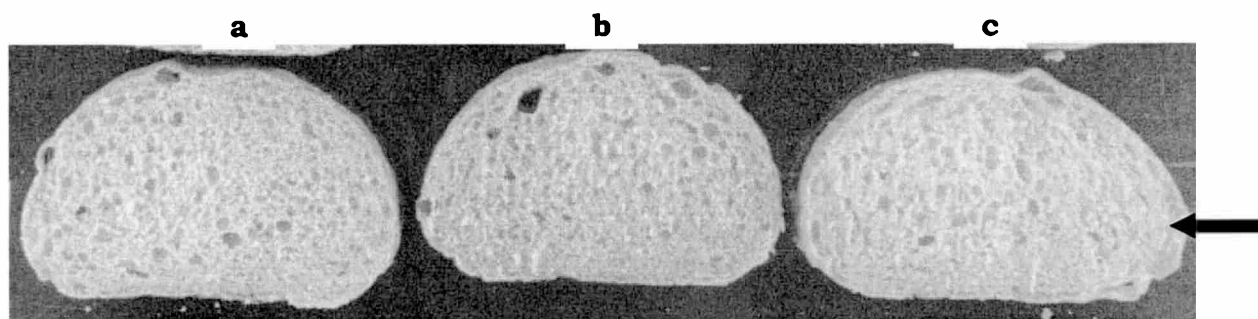


Figura 5.3. Aspecto interno de panes obtenidos a partir de masa control (a), de masas pre-cocidas por 13,5 min, almacenadas a 3°C (b) y a -18°C (c) por 8 días.

Efecto del tiempo de precocción sobre la evolución de la firmeza de los panes

Se estudió la velocidad de endurecimiento de la miga de pan en panes obtenidos de masas precocidas por distintos tiempos y almacenadas a temperaturas de refrigeración. Para esta experiencia se trabajó con masas precocidas (4,5; 9,0 y 13,5 min) y almacenadas a 3°C. Después de 8 días de almacenamiento se realizó la segunda cocción, los panes obtenidos se envasaron en películas de polietileno, y se almacenaron a 20°C. A distintos tiempos de almacenamiento (0, 1, 3 y 8 días) se tomaron 3 panes, se obtuvieron dos rodajas de la parte central de cada uno. Cada rodaja de pan se sometió a compresión. La Figura 5.3 muestra la velocidad de endurecimiento de la miga de pan.

En todos los casos la firmeza aumentó significativamente ($p < 0,05$) con el tiempo de almacenamiento del pan, mientras que no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la firmeza de los panes obtenidos de masas precocidas por distintos períodos de tiempo.

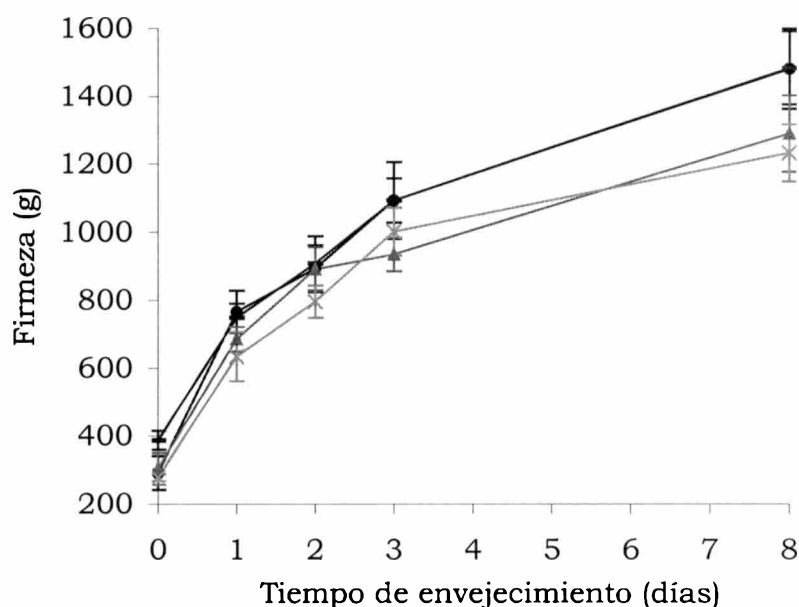


Figura 5.3. Variación de la firmeza de la miga de pan almacenada a 20°C obtenido de masa con distintos tiempos de precocción: 4,5 min (—); 9,0 min (-▲-); 13,5 min (-×-); y 18 min (-●-) (control).

Efecto del tiempo de precocción sobre la levadura

Se prepararon suspensiones con trozos (65,0 g) de la parte central de las piezas de masa precocida durante 4,5 y 13,5 min en 450 mL de solución estéril de peptona 0,1 %. Las muestras se incubaron en agar papa - dextrosa con el objeto de determinar si las levaduras sobrevivían a los tiempos de precocción. Ninguna de las muestras tuvo desarrollo de colonias, por lo que se concluye que las levaduras no sobrevivieron a las condiciones de precocción utilizados en el presente trabajo.

A partir de los resultados obtenidos en esta sección se concluye que el proceso de precocción - almacenamiento - cocción final de masas influyó negativamente sobre la calidad del producto final, como queda reflejado en el volumen de pan y la estructura de la hogaza. La pérdida de calidad fue mayor cuanto más corto fue el tiempo de precocción y más largo el de almacenamiento. Por otro lado, la firmeza de la miga de pan no se vio afectada por este proceso.

Es necesario profundizar los estudios sobre tipo de procesos para poder determinar cuales son los mecanismos por los cuales se produce una pérdida de calidad, predecir más exactamente el comportamiento de los productos obtenidos y proponer cambios en la formulación y en el método de elaboración para optimizar la calidad del pan elaborado.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En la elaboración de panes a partir de masas congeladas, generalmente, se aplican formulaciones complejas que permiten reducir los efectos nocivos del proceso de congelación. Estas formulaciones incluyen: lípidos, porcentajes más altos de levaduras y de agentes oxidantes, así como mezclas de distintos oxidantes, aditivos reforzadores de la matriz panaria como surfactantes o emulsionantes, gluten y harina de soja, azúcares, enzimas y en algunos casos, sólidos de leche (Hsu et al 1979a, Hsu et al 1979b, Wolt y D'Appolonia 1984a, Wolt y D'Appolonia 1984b, Neyreneuf y Van Der Plaat 1991, Inoue y Bushuk 1991, Inoue y Bushuk 1992, Inoue et al 1994, Wang y Ponte 1994, Wang y Ponte 1995, Rasanen et al 1995, El-Hady et al 1996, Nemeth et al 1996, Kenny et al 1999, Lu y Grant 1999, El-Hady et al 1999, Sahlstrom et al 1999, Perron et al 1999).

La formulación de masa utilizada en este trabajo es empleada en nuestro país para la elaboración de pan tipo francés, y es similar a la utilizada por otros autores en el método de elaboración de masas congeladas (Le Bail et al 1999, Havet et al 2000). Su simplicidad permite una clara observación de los cambios ocurridos durante el proceso de congelación y almacenamiento a -18°C de la masa. Por este motivo la pérdida de calidad en las masas debida al proceso de congelación y almacenamiento se magnifica, siendo relativamente grande, incluso mayor que en algunas publicaciones sobre el tema. En la industria, los problemas relacionados con la pérdida de calidad se manifiestan en mayor o menor grado dependiendo de las condiciones de trabajo, las materias primas y las formulaciones utilizadas.

Las masas congeladas se deterioraron gradualmente durante su almacenamiento como quedó demostrado por el menor volumen de los panes obtenidos, el mayor tiempo de fermentación, la estructura de miga más abierta y menos homogénea, y la falta de uniformidad en la hogaza. Los resultados alcanzados en este trabajo y los correspondientes a otros autores (Hsu et al 1979a, Hsu et al 1979b, Wolt y D'Appolonia 1984a, Wolt y D'Appolonia 1984b, Hino et al 1987, Berglund et al 1991,

Neyreneuf y Van Der Plaat 1991, Inoue y Bushuk 1991, Autio y Sinda 1992, Inoue y Bushuk 1992, Gelinas et al 1993, Rasanen et al 1995, Meric et al 1995, Nemeth et al 1996, Rasanen et al 1997a, Rasanen et al 1997b, Perron et al 1999, Le Bail et al 1999, Kenny et al 1999, Lu y Grant 1999, Havet et al 2000, Kenny et al 2001), han demostrado que estos cambios se deben a una combinación de dos factores. El primero de ellos es la disminución de la viabilidad y la actividad de las células de levaduras, como quedó demostrado por la disminución del número de células viables (52,4 %) y la pérdida de la capacidad de producción de CO₂ (27,7 %) después de 90 días de almacenamiento a -18°C. El segundo factor es la disminución de la capacidad de la masa para retener los gases producidos durante la fermentación y el horneado. Esto se reflejó en el debilitamiento de la estructura de la masa evidenciada mediante los parámetros viscoelásticos de la matriz panaria y la relación de forma de la hogaza de pan. Este debilitamiento de la masa durante el almacenamiento en estado congelado, se produjo por una pérdida de entrecruzamiento de la red de gluten, según se comprobó por la depolimerización de los agregados proteicos observada por electroforesis y cromatografía de exclusión molecular.

Uno de los factores responsables de la fuerza de la red tridimensional de proteínas en la masa es el tipo y concentración de los enlaces intermoleculares que se establecen entre las proteínas (Bushuk y MacRitchie 1987). El debilitamiento puede ser causado por: - las sustancias reductoras liberadas por las levaduras durante la congelación (Kline y Sigihara 1968, Hsu et al 1979a), - una redistribución del agua, - estos factores actuando en forma conjunta (Inoue y Bushuk 1991); o - por la acción mecánica de los cristales de hielo durante el proceso de congelación (Varriano-Marston et al 1980, Wolt y D'Appolonia 1984a, Berglund et al 1991, Autio y Sinda 1992). Los resultados encontrados en este trabajo indican que el debilitamiento se produce por la acción de varios factores actuando en forma conjunta. Se demostró que las levaduras liberaron sustancias nitrogenadas con capacidad reductora

como resultado de la congelación de las células y, se comprobó que estas sustancias afectan a las proteínas del gluten y a la calidad del pan.

Por otro lado, se observaron cambios en las propiedades de gelatinización del almidón y de retrogradación de la amilopectina durante el almacenamiento de la masa a -18°C , estos cambios fueron atribuidos a una redistribución y/o recristalización del agua del sistema durante el proceso de congelación. La recristalización causa una separación de las moléculas de agua de las macromoléculas a las que están normalmente adheridas. El movimiento del agua entre los componentes de la harina y los ingredientes de la masa sugiere una ruptura de las asociaciones gluten-almidón, las cuales pueden ser parte del proceso de deterioro de la masa (Kulp 1995).

También se observó durante la congelación y el almacenamiento de la masa a -18°C el daño causado por la acción mecánica del hielo sobre la estructura de la masa. Las observaciones mediante microscopía electrónica de las masas elaboradas con una formulación sin levadura, mostraron claramente los efectos del proceso de congelación y almacenamiento de la masa sobre su microestructura. Se observaron hebras de gluten más porosas y finas, así como el desprendimiento de pequeñas partículas que formaban parte de la red proteica y que, presumiblemente, fueron escindidas por la acción mecánica de los cristales de hielo (formación y crecimiento) durante la congelación y el almacenamiento en estado congelado de la masa.

Los inconvenientes provocados por la congelación de la masa fueron reducidos por el uso de aditivos. El DATEM, el gluten y la goma guar mejoraron la capacidad de las masas para retener su forma durante la elaboración y el volumen de pan, y produjeron una estructura más homogénea.

Los procesos de gelatinización del almidón y de fusión del complejo amilosa-lípido fueron afectados por el uso de DATEM y goma guar en la formulación como se reflejó en el aumento de la energía puesta en juego (variación de entalpía) en ambos procesos. Mientras que los cambios

provocados por la congelación y almacenamiento de las masas sin aditivos descritos previamente, fueron minimizados por la presencia de estos dos aditivos, indicando que los mismos influyeron en el proceso de redistribución y/o recristalización del agua durante los procesos de congelación y almacenamiento.

Por el contrario ninguno de los aditivos logró reducir el tiempo de fermentación de las piezas de masa congelada. Las masas aditivadas con DATEM y goma guar mostraron un debilitamiento de su estructura por la congelación similar al ocurrido en masas no aditivadas, como lo revelan los parámetros viscoelásticos y las microfotografías de barrido electrónico.

La formulación con cantidad extra de levaduras también logró contrarrestar, parcialmente, los efectos del proceso de congelación y almacenamiento de la masa.

El DATEM, en coincidencia con otros trabajos (Rao et al 1992, Kohler y Grosh 1999) produjo panes con una miga más blanda y disminuyó la velocidad de endurecimiento. Mientras que la goma guar sólo retrasó la velocidad de endurecimiento del pan. La temperatura de envejecimiento afectó la firmeza de la miga, en coincidencia con Pisesookbunterng y D'Appolonia (1983). Los panes almacenados a temperaturas más bajas mostraron una mayor velocidad de endurecimiento de la miga. Existen evidencias que indican que una temperatura de almacenamiento alta provoca una disminución en la recristalización de la estructura tipo B del almidón (Zobel y Kulp 1996).

En general la congelación de la masa no afectó la velocidad de endurecimiento de la miga de pan. Sólo los panes elaborados con DATEM y envejecidos a 3°C mostraron mayor firmeza cuando se obtuvieron a partir de masas congeladas en lugar de masas no congeladas. Estos resultados coinciden con la recristalización del almidón medida por difracción de rayos-X pero difieren de los obtenidos mediante de la calorimetría diferencial de barrido acerca de la retrogradación de amilopectina en masa congelada sin aditivos. La firmeza de la miga está relacionada con el volumen de pan, mientras mayor es el volumen y más

finas son las celdas de gas, menores son los valores de firmeza obtenidos (Eliasson y Larson 1993a, Zobel y Kulp 1996). Por otro lado, las dextrinas producidas por las α -amilasas mediante hidrólisis del almidón disminuyen la velocidad de endurecimiento y de retrogradación en geles de almidón y en panes (León et al 1997b, Defloor y Delcour 1999, Hug-Iten et al 2001, Rojas et al 2001, Duran et al 2001). Las α -amilasas producen α -maltosa, dextrinas y glucosa por ruptura de los enlaces $\alpha(1-4)$. Cuando el nivel de esta enzima en la harina es demasiado bajo, la fermentación no se produce a velocidades aceptables (Eliasson y Larson 1993b). La actividad amilolítica comienza tan pronto como el agua es agregada a la harina. Durante la producción de la masa la estructura granular del almidón se mantiene por una temperatura baja y constante, y la velocidad de acción enzimática no es afectada. La hidratación del almidón es baja, 50 % aproximadamente del agua disponible está asociada con el almidón y el porcentaje restante se distribuye entre proteínas insolubles, pentosanos, levaduras y la solución concentrada. Bajo estas condiciones, sólo la α -amilasa es capaz de hidrolizar los gránulos de almidón no dañados pero a una velocidad muy baja. Mientras que el almidón dañado es hidrolizado rápidamente por α - y β -amilasas. La cantidad de gránulos dañados depende de la intensidad de la molienda y se incrementa rápidamente con la presión de los rodillos. Los valores normales de almidón dañado son de 5-9 % (Drapron y Godon 1987). De acuerdo a lo expuesto, las diferencias existentes entre los valores de retrogradación de amilopectina (DSC), de recristalización del almidón (difracción de rayos-X) y de firmeza de la miga de pan (texturómetro) pueden deberse a la forma de preparación de las muestras. Las muestras analizadas por calorimetría diferencial de barrido tuvieron un proceso de descongelación - fermentación de 2 h de duración dentro de la cápsula, mientras que en la elaboración de pan (muestras utilizadas para los ensayos de difractometría y textura) el período de descongelación - fermentación varió con el tiempo de almacenamiento de la masa a -18°C y alcanzó las 3,3 h a los 60 días. Este aumento en el tiempo de descongelación - fermentación, necesario para poder obtener

panes con un volumen adecuado a partir de masas congeladas, pudo afectar la velocidad de recristalización de la amilopectina y el endurecimiento de pan mediante por una mayor producción de dextrinas. Otro factor que puede introducir diferencias, es el diferente contenido de humedad de las muestras fermentadas y horneadas en el DSC y las muestras de pan.

La elaboración de pan a través del método de masas precocidas es una alternativa al método de masas congeladas, aunque los tiempos de almacenamiento antes de su consumo son menores. El proceso de precocción - almacenamiento - cocción final de las masas influyó negativamente sobre el volumen de pan y la estructura de la hogaza. La pérdida de calidad fue mayor cuanto más corto fue el tiempo de precocción y más largo el de almacenamiento. Pese a que no se conoce exactamente el fenómeno que induce estos cambios, se especula que el producto puede ser fácilmente dañado debido a la falta de corteza y al exceso de humedad. Estos factores producen una estructura muy débil, que puede ser afectada durante su procesamiento. Por otro lado son productos muy susceptibles al crecimiento microbiano debido a su alto contenido de humedad (Brown 1993).

El producto final posee una estructura abierta que puede secarse velozmente (Brown 1993). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la firmeza de la miga de pan no se vio afectada por este proceso. Esto puede deberse a la diferencia de humedad de los productos, provocada por los diferentes tiempos de cocción.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC. American Association of Cereal Chemists. 1995. Approved Methods of the AACC. Ninth Edition The Association. USA.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. 1983. Energy conversion: mitochondria and chloroplasts. En: Biology of the Cell. Editado por Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. Garland Publishing, USA. 484-549.
- Alexander, R. 1999. Hydrocolloid gum- Part I: natural products. Cereal Food World, 44:684-686.
- Almeida, M. y Pais, C. 1996. Leavening ability and freeze tolerance of yeast isolated from traditional corn and rye bread doughs. App. Environmental Micro., 62:4401-4404.
- Anónimo. 1999. Alternatives to scratch baking. Baking Update, 214.
- Armero, E. y Collar, C. 1998. Crumb firming kinetics of wheat breads with anti-staling additives. J. Cereal Sci., 28:165-174.
- Autio, K. y Sinda, E. 1992. Frozen doughs: rheological changes and yeast viability. Cereal Chem., 69:409-413.
- Belitz, H. y Grosch, W. 1999a. Water. En: Food Chemistry, Second Edition. Editado por Belitz, H. y Grosch, W. Springer, Germany. 1-7.
- Belitz, H. y Grosch, W. 1999b. Cereals and cereal products. En: Food Chemistry, Second Edition. Editado por Belitz, H. y Grosch, W. Springer, Germany. 631-692.
- Belitz, H. y Grosch, W. 1999c. Polysaccharides. En: Food Chemistry, Second Edition. Editado por Belitz, H. y Grosch, W. Springer, Germany. 237-318.
- Belitz, H., Kieffer, R., Seilmeier, W. y Wieser, H. 1986. Structure and function of gluten protein. Cereal Chem., 63:336-341.
- Belton, P. 1999. On the elasticity of wheat gluten. J. Cereal Sci., 29:103-107.

- Berglund, P., Shelton, D. y Freeman, T. 1991. Frozen bread dough ultrastructure as affected by duration of frozen storage and freeze-thaw cycles. *Cereal Chem.*, 68:105-107.
- Betchel, W. 1955. A review of bread staling research. *Cereal Chem.*, 13:108-121.
- Bietz, J. 1979. Recent advances in the isolation and characterization of cereal protein. *Cereal Foods World*, 24:199-207.
- Bietz, J. y Wall, J. 1980. Identity of high molecular weight gliadin and ethanol-soluble glutenin subunits of wheat: relation to gluten structure. *Cereal Chem.*, 57:415-421.
- Biliaderis, C. 1990. Thermal analysis of food carbohydrates. En: *Thermal Analysis of Foods*. Editado por Harwalkar, V. y Ma, C. Elsevier, England. 168-220.
- Biliaderis, C., Maurice, T. y Vose, J. 1980. Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.*, 45:1669-1674.
- Bloksma, A. 1971. Rheology and chemistry of dough. En: *Wheat Chemistry and Technology*, Second Edition. Editado por Pomeranz, Y. American Association of Cereal Chemists, USA. 523-584.
- Bloksma, A. 1985. Rheological aspects of structural changes during baking. En: *Chemistry and Physics of Baking*. Editado por Blanshard, J., Frazier, P. y Galliard, T. The Royal Society of Chemistry, England. 171-178.
- Bottomley, R., Kearns, H. y Schofield, J. 1982. Characterization of wheat flour and gluten proteins using buffers containing sodium dodecyl sulphate. *J. Sc. Food Agric.*, 33:481-491.
- Brown, J. 1985. Uses of part-baked products. *Baking Today*, Marzo:47-48.
- Brown, J. 1993. Advances in breadmaking technology. En: *Advances in Breadmaking Technology*. Editado por Kamel, B y Stauffer, C. Blackie A&P. USA. 39-87.

- Brümmer, J. 1995. Bread and rolls from frozen dough in Europe. En: Frozen and Refrigerated Doughs and Batter. Editado por Kulp, K., Lorenz, K y Brummer, J. American Association of Cereal Chemists, Estados Unidos de América. 163-164.
- Buleón, A., Colonna, P., Planchot, V. y Ball, S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International J. Biol. Macromolecules*, 23:85-112.
- Burt, D. y Russel, P. 1983. Gelatinization of low water content wheat starch-water mixtures. *Starch*, 35:354-360.
- Bushuk, W. y MacRitchie, F. 1987. Wheat proteins: aspect of structure that are related to breadmaking quality. En: Protein Quality and Effects of Processing. Editado por Phillips, R. y Finley, J. Marcel Dekker, USA. 357-361. Citado por Kulp 1995.
- Casey, G. y Foy, J. 1995. Yeast performance in frozen doughs and Strategies for improvement. En: Frozen and Refrigerated Doughs and Batter. Editado por Kulp, K. Lorenz, K, y Brummer, J. American Association of Cereal Chemists, USA. 19-51.
- Cauvain, S. 1998. Improving the control of staling in frozen bakery products. *Food Sc. Technology*, 9:56-61.
- Chinachoti, P., Kim-Shim, M., Mari, F. y Lo, L. 1991. Gelatinization of wheat starch in the presence of sucrose and sodium chloride: correlation between gelatinization temperature and water mobility as determined by oxygen-17 NMR. *Cereal Chem.*, 68:245-248.
- Christianson, D., Hodge, J., Osborne, D. y Detroit R. 1981. Gelatinization of wheat starch as modified by xanthan gum, guar gum and cellulose gum. *Cereal Chem.*, 58:513-517.
- Chung, O., Pomeranz, Y., Hwang, E. y Dikemen, E. 1979. Defatted and reconstituted wheat flours. IV. Effects of flour lipids on protein extractability from flour that vary in bread-making quality. *Cereal Chem.*, 56:220-226.

- Ciaffi, M., Tozzi, L. y Lafiandra, D. 1996. Relationship between flour protein composition determined by size exclusion high performance liquid chromatography and dough rheological parameters. *Cereal Chem.*, 73:346-351.
- Cobopa. 1996. Folleto "Novedades". Valencia, España. 2.
- Colonna, P. y Mercier, C. 1985. Gelatinization and melting of maize and pea starches with normal and high-amylose genotypes. *Phytochemistry*, 24:1667-1674.
- Conover, W. 1999. Some Methods Based on Ranks. En: *Practical Nonparametric Statistics*, 3^o Editions. Editado por Conover, W. John Wiley & Sons, USA. 312-314
- Cooper, E. y Reed, G. 1968. Yeast fermentation –effects of temperature, pH, ethanol, sugars, salt and osmotic pressure. *Baker's Dig.*, 42:22-26.
- Cullen-Refai, A., Faubion, J. y Hosney, R. 1988. Lubricated uniaxial compression of fermenting doughs. *Cereal Chem.*, 65:401-403.
- D'Appolonia, B. y Rayas-Duarte, P. 1994. Wheat carbohydrates: structure and functionality. En: *Wheat Production, Properties and Quality*. Editado por Bushuk, W. y Rasper, V. Blackie A & P, England. 107-127.
- Defloor, I. y Delcour, J. 1999. Impact of maltodextrins and antistaling enzymes on the differential scanning calorimetry staling endotherm of baked bread doughs. *J. Agric. Food Chem.*, 47:737-741.
- Dhingra, O. y Sinclair, J. 1985. Culture media and their formulas. En: *Basic Plant Pathology Methods*. Editado por Dhingra, D. y Sinclair, J. CRC Press, USA. 285-315
- Donovan, J. 1977. A study of the baking process by differential scanning calorimetry. *J. Sci. Food Agric.*, 28:571-578.
- Donovan, J. 1979. Phase transitions of starch-water system. *Biopolymers*, 18:263-275.
- Donovan, J. y Mapes, C. 1980. Starch multiple phase transitions of starches and Negeli amyloextrins. *Starch*, 32:190-193.

- Dragsdorf, R., y Varriano-Marston, E. 1980. Bread staling: X-ray diffraction studies on bread supplemented with α -amylases from different sources. *Cereal Chem.*, 57:310-314.
- Drapron, R. y Godon, B. 1987. Role of enzymes in baking. En: *Enzymes and their Role in Cereal Technology*. Editado por Kruger, J., Lineback, D. y Stauffer, C. American Association of Cereal Chemists, USA. 281-234.
- Dubois, D. y Blockolsky, D. 1986. Frozen bread dough. Effect of dough mixing and thawing methods. *American Inst. Baking Technological Bull.*, 86:1-7.
- Duran, E., León, A., Barber, B. y Benedito de Barber, C. 2001. Effect of low molecular weight dextrans on gelatinization and retrogradation of starch. *Eur. Food Res. Technol.*, 212:203-207.
- El-Hady, E., El-Samahy, S. y Brummer, J. 1999. Effects of oxidants, sodium-stearoyl-2-lactylate and their mixtures on rheological and baking properties of nonprefermented frozen doughs. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 32:446-454.
- El-Hady, E., El-Samahy, S., Seibel, W. y Brummer, J. 1996. Changes in gas production and retention in non-prefermented frozen wheat doughs. *Cereal Chem.*, 73:472-477.
- Eliasson, A. 1992. A calorimetric investigation of the influence of sucrose on the gelatinization of starch. *Carbohydrate Polymers*, 18:131-138.
- Eliasson, A. y Gudmundsson, M. 1996. Starch: Physicochemical and functional aspects. En: *Carbohydrates in Food*. Editado por Eliasson, A. Marcel Dekker, USA. 431-503.
- Eliasson, A. y Larson, K. 1993a. Bread. En: *Cereals in Breadmaking*. Editado por Eliasson, A. y Larson, K. Marcel Dekker, USA. 325-363.
- Eliasson, A. y Larson, K. 1993b. Dough. En: *Cereals in Breadmaking*. Editado por Eliasson, A. y Larson, K. Marcel Dekker, USA. 261-324.

- Eliasson, A. y Larson, K. 1993c. Physicochemical behavior of the components of wheat flour. En: *Cereals in Breadmaking*. Editado por Eliasson, A. y Larson, K. Marcel Dekker, USA. 31-159.
- Evans, I. y Haisman, D. 1982. The effects of solutes on the gelatinization temperature of potato starch. *Starch*, 34:224-230.
- Ewart, J. 1979. Glutenin structure. *J. Sci. Food Agric.*, 23:687-699.
- Franks, F., Mathias, S., Galfre, P. y Brown, D. 1983. Ice nucleation and freezing in undercooled cells. *Cryobiology*, 20:298-309.
- Frida Alimentaria. 1996. Folleto "Pasión por la calidad". España. 12.
- Gao, L., Ng, P. y Bushuk, W. 1992. Structure of glutenin based on farinograph and electrophoretic results. *Cereal Chem.*, 69:452-455.
- Gélinas, P., McKinnon, C., Lukow, O. y Townley-Smith, F. 1996. Rapid evaluation of frozen and fresh doughs involving stress conditions. *Cereal Chem.*, 73:767-769.
- Ghiassi, K., Hosney, R., y Varriano-Marston, E. 1983. Effects of flour components and dough ingredients on starch gelatinization. *Cereal Chem.*, 60:58-61.
- Giborau, A., Cuvelier, G. y Launay, B. 1994. Rheological behaviour of three biopolymer/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. *J. Texture Stud.*, 25:119-137. Citado por: Puppo 1997.
- Graveland, A., Bongers, P. y Bosveld, P. 1979. Extraction and fractionation of wheat flour proteins. *J. Sc. Food Agirc.*, 30:71-84.
- Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendorf, W., Marseille, J., Moonen, J. y Scheepstra, A. 1985. A model for the molecular structure of the glutenins from wheat flour. *J. Cereal Sci.*, 3:1-16.
- Greenwood, C. 1976. Starch. En: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 1. Editado por Pomeranz, Y. American Association of Cereal Chemists. USA. 119-157.

- Havet, M., Mankai, M. y Le Bail, A. 2000. Influence of the freezing condition on the baking performances of French frozen dough. *J. Food Engineering*, 45:139-145.
- Heflich, L. 1996. A baker's perspective. En: *Baked Goods Freshness: Technology, Evaluation and Inhibition of Staling*. Editado por Hebeda, R. y Zobel, H. Marcel Dekker, USA. 239-256.
- Hino, A., Takano, H. y Tanaka, Y. 1987. New freeze-tolerant yeast from frozen dough preparations. *Cereal Chem.*, 64:269-275.
- Holmes, J. y Hoseney, C. 1987. Frozen Doughs: Freezing and thawing rates and the potencial of using a combination of yeast and chemical leavening. *Cereal Chem.*, 64:348-351.
- Hoseney, C. 1994a. Rheology of doughs and batters. En: *Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition*. Editado por Hoseney, C. American Association of Cereal Chemists, USA. 213-228.
- Hoseney, C. 1994b. Yeast-leavened products. En: *Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition*. Editado por Hoseney, C. American Association of Cereal Chemists, USA. 229-273.
- Hoseney, C. 1994c. Starch. En: *Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition*. Editado por Hoseney, C. American Association of Cereal Chemists, USA. 29-64.
- Hoseney, C. 1994d. Gluten proteins. En: *Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition*. Editado por Hoseney, C. American Association of Cereal Chemists, USA. 197-211.
- Hoseney, C. 1994e. Minor components. En: *Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition*. Editado por Hoseney, C. American Association of Cereal Chemists, USA. 81-101.
- Hosomi, K., Nishio, K. y Matsumoto, H. 1992. Studies on frozen dough baking. I. Effects of egg yolk and sugar ester. *Cereal Chem.*, 69:89-92.
- Hsu, K., Hoseney R. y Seib, P. 1979a. Frozen Dough. I. Factors affecting stability of yeasted doughs. *Cereal Chem.*, 56:419-424.

- Hsu, K., Hoseney R. y Seib, P. 1979b. Frozen Dough. II. Effects of Freezing and Storing Conditions on the Stability of Yeasted Doughs. *Cereal Chem.*, 56:424-426.
- Huang, D. y Khan, K. 1997. Characterization and quantification of native glutenin aggregates by multistacking sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE procedures. *Cereal Chem.*, 74:229-234.
- Huebner, F. y Bietz, J. 1993. Improved chromatographic separation and characterization of ethanol-soluble wheat proteins. *Cereal Chem.*, 70:506-511.
- Hug-Itten, S., Escher, F. y Conde-Petit, B. 2001. Structural properties of starch in bread and bread model systems: influence of an antistaling α -amylase. *Cereal Chem.*, 78:421-428.
- Inoue, Y. y Bushuk, W. 1991. Studies on frozen dough. I. Effects of frozen storage and freeze-thaw cycles on baking rheological properties. *Cereal Chem.*, 68:627-631.
- Inoue, Y. y Bushuk, W. 1992. Studies on frozen dough. II. Flour quality requirements for bread production from frozen dough. *Cereal Chem.*, 69:423-428.
- Inoue, Y., Sapirstein, H. y Bushuk, W. 1995. Studies on frozen doughs. IV. Effect of shortening systems on baking and rheological properties. *Cereal Chem.*, 72:221-226.
- Inoue, Y., Sapirstein, H., Takayanagi, S. y Bushuk, W. 1994. Studies on frozen doughs. III. Some factors involved in dough weakening during frozen storage and thaw-freeze cycles. *Cereal Chem.*, 71:118-121.
- Jones, R., Taylor, N., y Senti, F. 1959. Electrophoresis and fractionation of wheat gluten. *Arch. Biochem. Biophys.*, 84:353-376.
- Jovanovich G. 1997. Estudio de las interacciones entre almidón y lípidos en harina de trigo. Tesis Doctoral. Facultad De Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

- Jovanovich, G., Zamponi, R., Lupano, C. y Añón, M. C. 1992. Effect of water content on the formation and dissociation of the amylose-lipid complex in wheat flour. *J. Agric. Food Chem.*, 40:1789-1793.
- Kamel, B. y Ponte, J. 1993. Emulsifiers in baking. En: *Advances in Baking Technology*. Editado por Kamel, B. y Stauffer, C. Blackie A & P, England. 179-222.
- Kasarda, D., Bernardin, J. y Nimmo, C. 1976. Wheat proteins. En: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 1. Editado Pomeranz, Y. American Association of Cereal Chemists. USA. 158-236.
- Kenny, S., Wehrle, K., Auty, M., y Arendt, E. 2001. Influence of sodium caseinate and whey protein on baking properties and rheology of frozen dough. *Cereal Chem.*, 78:458-463.
- Kenny, S., Wehrle, K., Dennehy, T, y Arendt, E. 1999. Correlations between empirical and fundamental rheology measurements and baking performance of frozen bread dough. *Cereal Chem.*, 76:421-425.
- Khan, K. y Bushuk, W. 1979. Studies of glutenin. XII. Comparison of SDS-PAGE of unreduced and reduced glutenin from various isolation and purification procedures. *Cereal Chem.*, 56:63-68.
- Kim, C. y Walker, C. 1992. Effects of sugars and emulsifiers on starch gelatinization evaluated by differential scanning calorimetry. *Cereal Chem.*, 69:212-217.
- Kline, L. y Sugihara, T 1968. Factors affecting the stability of frozen breads doughs. I. Prepared by straight dough method. *Bakers Dig.* 425:44. Citado por Wolt y D'appolonia 1984b.
- Knightly, W. 1977. The staling of bread. A review. *Baker's Digest*, 51:52-56.
- Kohler, P. y Grosh, W. Study of the effect of DATEM. 1. Influence of fatty acid chain length on theology and baking. *J. Agric. Food Chem.*, 47:1863-1896.

- Kokelaar, J., van Vilet, T. y Prins, A. 1996. Strain hardening properties and extensibility of flour and gluten doughs in relation to breadmaking performance. *J. Cereal Sc.*, 24:199-214.
- Kugimiya, M., Donovan, J. y Wong, R. 1980. Phase transitions of amylose-lipids complexes in starches: a calorimetric study. *Starch*, 32:265-270.
- Kulp, K. 1995. Biochemical and biophysical principles of freezing. En: *Frozen and Refrigerated Doughs and Batter*. Editado por Kulp, K., Lorenz, K. y Brummer, K. American Association of Cereal Chemists, USA. 63-89.
- Kulp, K., Lorenz, K y Brummer, J. 1995. Preface. En: *Frozen and Refrigerated Doughs and Batter*. Editado por Kulp, K., Lorenz, K. y Brummer, K. American Association of Cereal Chemists, USA. v-vi.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-684.
- Larroque, O., Gianibelli, M., Gomez Sánchez, M. y MacRitchie, F. 2000. Procedure for obtaining stable extracts of cereal flour and whole meal for size-exclusion HPLC analysis. *Cereal Chem.*, 77:448-450.
- Le Bail, A., Grinand, C., Le Cleach, S., Martinez, S. y Quilin, E. 1999. Influence of storage conditions on frozen French bread dough. *J. Food Engineering*, 39:289-291.
- León, A., Duran, E. y Benedito de Barber, C. 1997a. A new approach to study starch changes occurring in the dough-baking process and during bread storage. *Z. Lebensm. Unters. Forsh. A*, 204:316-320.
- León, A., Duran, E. y Benedito de Barber, C. 1997b. Firming of starch gels and amylopectin retrogradation as related to dextrin production by α -amylase. *Z. Lebensm. Unters Forsh A.*, 205:131-134.
- Leuschner, R., O'Callaghan, M y Arendt, E. 1998. Bacilli spoilage in part-baked and rebaked brown soda bread. *J. Food Sc.*, 63:915-918.

- Leuschner, R., O'Callaghan, M y Arendt, E. 1999. Moisture distribution and microbial quality of part baked breads as related to storage and rebaking conditions. *J. Food Sc.*, 64:543-546.
- Lindahl, L. 1990. Rheological properties in wheat flour systems. Molecular and interfacial basis. Thesis Doctoral. Lund University, Sweden.
- Lindsay, M. y Skerritt, J. 1999 The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trends Food Sci. Techn.*, 10:247-253.
- Lorenz, K. y Kulp, K. 1995. Doughs for bread and rolls in the United States. En: *Frozen and Refrigerated Doughs and Batter*. Editado por Kulp, K., Lorenz, K y Brummer, J. American Association of Cereal Chemists, USA. 135-153.
- Lu, W. y Grant, L. 1999. Effects of prolonged storage at freezing temperatures on starch and baking quality of frozen doughs. *Cereal Chem.*, 76:656-662.
- MacKey, J. 1975. The boundaries and subdivision of the genus *Triticum*. *Int. Bot. Congr.*, 12th, 2: 509.
- MacMaster, G. y Bushuk, W. 1983. Protein carbohydrates complexes in gluten: fractionation and proximate composition. *J. Cereal Sc.*, 1:177-184.
- MacRitchie, F. y Lafandra, D. 1997. Structure-function relationships of wheat proteins. En: *Food and their Applications*. Editado por Damodaran, S. y Paraf, A. Marcel dekker, USA. 293-324. Citado en: Lindsay y Skerritt 1999.
- Martin, M., Zeleznak, K. y Hoseney, R. 1991. A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. *Cereal Chem.*, 68:498-503.
- Masi, P., Cavella, S. y Sepe, M. 1998. Characterization of dynamic viscoelastic behavior of wheat flour doughs at different moisture content. *Cereal Chem.*, 75:428-432.

- Matz, S. 1999a. Ingredients from wheat. En: Bakery Technology and Engineering, 3° Edition. Editado por Matz, S. Pan-Tech Internacional, USA. 1-21.
- Matz, S. 1999b. Leaveners and yeast food. En: Bakery Technology and Engineering, 3° Edition. Editado por Matz, S. Pan-Tech Internacional, USA. 53-75.
- Mazur, P. 1965. The roll of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. Ann. N.Y. Acad. Sci., 124:658-676.
- Mazur, P. 1970. Cryobiology: the freezing of biological systems. Science, 168:939-949.
- Meric, L., Lambert-Guilois, S, Neyreneuf, O. y Richard-Molard, D. 1995. Cryoresistance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in frozen dough: contribution of cellular trehalose. Cereal Chem., 72:609-615.
- Meryman, H. 1968. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. Nature, 218:333-336.
- Miller, K. y Hosney, R. 1999. Dynamic rheological properties of wheat starch-gluten doughs. Cereal Chem., 76:105-109.
- Milo Ohr, L. 2001. Stabilizers Enhance Texture of Ice Cream Novelties. Prepared Foods, Marzo 2001.
- Nakagawa, S. y Ouchi, K. 1994. Construction from a single parent baker's yeast strains with high freeze tolerance and fermentative activity in both lean and sweet doughs. App. Environmental Microb., 60:3499-3502.
- Nemeth, L, Paulley, F. y Preston, K. 1996. Effects of ingredients and processing conditions on the frozen dough bread quality of a Canada western red spring wheat flour during prolonged storage. Food Research International, 29:609-616.
- Neyreneuf, O. y Van Der Plaat, J. 1991. Preparation of frozen french bread dough with improved stability. Cereal Chem., 68:60-66.

- Ng, P. y Bushuk, W. 1987. Glutenin of marquis wheat as a reference for estimating molecular weights of glutenin subunits by sodium sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.*, 64:324-327.
- Ng, P., Xu, C. y Bushuk, W. 1991. Model of glutenin structure based on farinograph and electrophoretic results. *Cereal Chem.*, 68:231-235.
- Osborne, T. 1907. Proteins of the wheat kernel. Publication of the Carnegie Institution Washington, 84:1-119.
- Pantanelli, A. 1999. Productos de Panificación. Alimentos Argentinos, Julio:25-28.
- Payne, P. y Corfield, K. 1979. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in dissociating medium. *Planta*, 145:83-88.
- Perron, C., Lukow, O., Bushuk, W., y Townley-Smith, F. 1999. The blending potential of diverse wheat cultivars in a frozen dough system. *Cereal Food World*, 44:667-672.
- Petrofsky, K. y Hoseney, R. 1995. Rheological properties of dough made with starch and gluten from several cereal sources. *Cereal Chem.*, 72:53-58.
- Pisesookbuntern, W. y D'apponia, B. 1983. Bread staling studies. I. Effect of surfactants on moisture migration from crumb to crust and firmness values of bread crumb. *Cereal Chem.*, 60:298-300.
- Pisesookbuntern, W., D'apponia, B. y Kulp, K. 1983. Bread staling studies. II. The role of refreshing. *Cereal Chem.*, 60:301-305.
- Pogna, N., Redaelli, R., Dachkevitch, A. y Dal Belin Peruffo, A. 1994. Genetics of wheat quality and its improvement by conventional and biotechnological breeding. En: *Wheat Production, Properties and Quality*. Editado por Bushuk, W. y Rasper, V. Chapman & Hall, USA. 205-224.
- Ponte, J., Glass, R. y Geddes, W. 1960. Studies on the behavior of activate dry yeast in breadmaking. *Cereal Chem.*, 37:263-267.

- Puppo, M. 1997. Propiedades gelificantes de las proteínas de soja a pH ácido. Tesis Doctoral. Facultad De Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Quaglia, G. 1991a. El frío en la producción de pan. En: Ciencia y Tecnología de la Panificación. Editado por Quaglia, G. Acribia, España. 401-416.
- Quaglia, G. 1991b. La fermentación. En: Ciencia y Tecnología de la Panificación. Editado por Quaglia, G. Acribia, España. 297-328.
- Rao, P., Nussinovitch, A. y Chinachoti, P. 1992. Effects of selected surfactants on amilopectin recrystallization and on recoverability of bread crumb during storage. *Cereal Chem.*, 69:613-618.
- Rasanen, J., Blanshard, J., Siitari-Kauppi, M. y Autio, K. 1997b. Water distribution in frozen lean wheat doughs. *Cereal Chem.*, 74:806-813.
- Rasanen, J., Harkonen, H. y Autio, K. 1995. Frezze-thaw stability of prefermented frozen lean wheat dough: effect of flour quality and fermentation time. *Cereal Chem.*, 72:637-642.
- Rasanen, J., Laurikainen, T. y Autio K. 1997a. Fermentation stability and pore distribution of frozen prefermented lean wheat doughs. *Cereal Chem.*, 74:56-62.
- Ribotta, P., León, A. y Añón, M. 2001. Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality. *J. Agric. Food Chem*, 49:913-918.
- Rojas, J., Rossel, C., Benedito de Barber, C., Pérez-Munuera, I. y Lluch, M. 2000. The baking process of wheat rolls followed by cryo scsnning electron microscopy. *Eur. Food Res. Technol.*, 212:57-63.
- Rojas, J., Rossel, C. y Benedito de Barber, C. 2001. Role of maltodextrins in the staling of starch gels. *Eur. Food Res. Technol.*, 212:364-368.
- Ross-Murphy, S. B. 1995. Rheology of biopolymer solutions and gels. En: *New Physico-Chemical Techniques for the Chracterization of Complex Food Systems*. Editado por Dickinson, E. Blackie Academic & Professional, England. 130-156. Citado por Puppo 1997.

- Sahlstrom, S., Nielsen, A., Faergestad, E., Lea, P., Park, W. y Ellekjaer, M. 1999. Effect of dough processing conditions and DATEM on Norwegian hearth bread prepared from frozen dough. *Cereal Chem.*, 76:38-44.
- Sapirstein, H., Roller, R. y Bushuk, W. 1994. Instrumental measurement of bread crumb grain by digital image analysis. *Cereal Chem.*, 71:383-391.
- Schluntz, E., Steffe, J. y Ng, P. 2000. Rheology and microstructure of wheat dough developed with controlled deformation. *J. Texture Stud.*, 31:41-54.
- Schoch, T. y French, D. 1947. Studies on bread staling. I. The role of starch. *Cereal Chem.*, 24:231-249. Citado por Zobel y Kulp 1996.
- Seilmeier, W., Wieser, H. y Belitz, H. 1987. High-performance liquid chromatography of reduced glutenin: amino acid composition of fractions and components. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 185:487-489.
- Shewry, P., Popineau, I., Lafiandra, D. y Belton, P. 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the Eurowheat project. *Trends Food Sc. Tech.*, 11:433-441.
- Shima, J., Hino, A., Yamada-Iyo, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Mori, K. y Takano, H. 1999. Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalose mutants derived from commercial baker's yeast. *App. Environmental Microb.*, 65:2841-2846.
- Singh, N., Donovan, G., Batey, I. Y MacRitchie, F. 1990. Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. I. Dissolutions of total proteins in the absence of reducing agents. *Cereal Chem.*, 67:150-161.
- Singh, N., Shepherd, K., Langridge, P. y Gruen, L. 1991. Purification and biochemical characterization of tritacin, a legume-like protein in wheat endosperm. *J. Cereal Sci.*, 13:207-220.

- Spies, R. y Hosney, R. 1982. Effect of sugars on starch gelatinization. *Cereal Chem.*, 59:128-131.
- Stauffer, C. 1993. Frozen dough production. En: *Advances in Baking Technology*. Editado por Kamel, B. y Stauffer, C. Chapman and Hall, USA. 88-106.
- Tamstorf, S., Jonsson, T. y Krog, N. 1986. The role of fats and emulsifiers in baked products. En: *Chemistry and Physics of Baking*. Editado por Blanshard, J., Frazier, P. y Galliard, T. The Royal Society of Chemistry, England. 75-88.
- Tan, J., Zhang, H. y Gao, X. 1997. SEM image processing for food structure análisis. *J. Texture Studies*, 28:657-672.
- Tatham, A., Miñin, B. y Shewry, P. 1985. The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: relationship to gluten elasticity. *Cereal Chem.*, 62:405-412.
- Tatham, A. 1995. The structures of wheat protein. En: *Wheat Structure. Biochemistry and Funcctionality*. Editado por Schofield, J. Royal society of Chemistry, England. 53-63.
- Van Dijck, P., Gorwa, M., Lemaire, K., Teunissen, A., Versele, M., Colombo, S., Dumortier, F., Ma, P., Tanghe, A., Loiez, A. y Thevelein, J. 2000. Characterization of a new set of mutants deficient in fermentation-induced loss of stress resistance for use in frozen dough applications. *Int. J. Food Microbiology*, 55:187-192.
- Varriano-Marston, E., Hsu, H. y Mahdi, J. 1980. Rheological and structural changes in frozen dough. *Baker's Dig.*, 54:32-34.
- Wall, J. 1979. The role of wheat proteins in determining baking quality. En: *Recent Advances in the Biochemistry of Cereals*. Editado por Laidman, L. y Win Jones, R. Academic Press, USA. 275-311.
- Wang, Z. y Ponte, J. 1994. Improving frozen dough qualities with the addition of vital wheat gluten. *Cereal Food World*, 39:500-503.

- Wang, Z. y Ponte, J. 1995. Storage stability of gluten-fortified frozen dough. *Cereal Food World*, 40:827-831.
- Weegels, P., Harmer, R. y Schofield, J. 1997 Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. II Changes in composition. *J. Cereal Sci.*, 25:155-163.
- Weegels, P., van der Pijpekamp, A., Graveland, A., Harmer, R. y Schofield, J. 1996. Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *J. Cereal Sci.*, 23:103-111.
- Wieser, H. 2000. Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. I. Qualitative and quantitative composition of gluten protein types. *Eur. Food Res. Technol.*, 211:262-268.
- Wieser, H., Mödl, A., Seilmeier, W. y Belitz, H. 1987. HPLC of gliadins from different wheat varieties: amino acid composition and N-terminal amino acid sequence of components. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. A*, 185:371-378.
- Wolt, M. And D'appolonia, B. 1984a. Factors involved in the stability of frozen doughs. I. The influence of yeast reducing compounds on frozen-dough stability. *Cereal Chem.*, 61:209-212.
- Wolt, M. y D'appolonia, B. 1984b. Factors involved in the stability of frozen dough. II. The effects of yeast type, flour type and dough additives on frozen-dough stability. *Cereal Chem.*, 61:213-221.
- Wootton, M. y Bamunuarachchi, A. 1980. Applications of differential scanning calorimetry to starch gelatinization. III. Effect of sucrose and sodium chloride. *Starch*, 32:126-131.
- Woychic, J., Boundy, J. y Dimler, R. 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.*, 94:477-482.
- Wrigley, C. 1996. Giants proteins with flour power. *Nature*, 381:738-742.

- Wrigley, C., Andrews, J., Bekes, F., Gras, P., Gupta, R., MacRitchie, F., y Skerritt, J. 1998. Protein-protein interactions-essential to dough rheology. En: *Interactions: The Keys to Cereal Quality*. Editado por Hamer, R. y Hoseney, R. American Association of Cereal Chemists, USA. 18-20.
- Xu, A., Chung, O., and Ponte, J. 1992. Bread crumb amylograph studies. I. Effects of storage time, shortening, flour lipids, and surfactants. *Cereal Chem.*, 69:495-501.
- Zanoni, B., Smaldone, D. y Schiraldi, A. 1991. Starch gelatinization in chemically leavened bread baking. *J. Food Sc.*, 56:1702-1706.
- Zawistowska, U., Bekes, F. y Bushuk, W. 1985. Gluten proteins with high affinity to flour lipids. *Cereal Chem.*, 62:284-289.
- Zeleny, L. 1971. Criteria of wheat quality. En: *Wheat Chemistry and Technology*, Second Edition. Editado por Pomeranz, Y. American Association of Cereal Chemists, USA. 19-49.
- Zelevnak, K. y Hoseney, R. 1986. The role of water in the retrogradation of wheat starch gels and bread crumb. *Cereal Chem.*, 63:407-411.
- Zobel, H. 1988a. Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch*, 40:44-50.
- Zobel, H. 1988b. Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch*, 40:1-7.
- Zobel, H. y Kulp, K. 1996. The staling mechanism. En: *Baked Goods Freshness*. Editado por Hebeda E., Zobel H. Marcel Dekker, USA. 1-64.
- Zobel, H., Young, S. y Rocca, L. 1988. Starch gelatinization: an X-ray study. *Cereal Chem.*, 65:443-446.

1000
1000

1000
1000

1000
1000

1000
1000

1000
1000